

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II Großhadern
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. B. Göke

In-vivo Metabolismus der VLDL-Apolipoproteine ApoB, ApoCIII und ApoE

**Turn-over Untersuchungen zum Apolipoprotein-Stoffwechsel
unter Verwendung von mit stabilen Isotopen
markierten Aminosäuren als Tracer**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Regina Dinkel

aus Gräfelfing

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. K. G. Parhofer

Mitberichterstatter: PD Dr. med. M. Schmolke
PD Dr. med. Th. Lang

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2002

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	5
1.1 Allgemeine Vorbemerkung	5
1.2 Lipoproteine: Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften	7
1.3 Stoffwechsel der Lipoproteine	9
1.3.1 Exogener Weg	9
1.3.2 Endogener Weg	10
1.3.3 Reverser Cholesterintransport	11
1.4 Apolipoproteine	12
1.4.1 ApoB100 und ApoB48	12
1.4.2 ApoC	13
1.4.3 ApoE	14
1.5 Vorbemerkungen zur Methodik	16
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	18
2. Methodik	19
2.1 Probanden	19
2.2 Studienprotokoll	21
2.3 Materialien, technische Ausstattung und analytische Verfahren	22
2.3.1 Endogener Tracer	22
2.3.2 Isolierung der Lipoproteinfraktionen	22
2.3.3 Isolation der Apolipoproteine	23
2.3.4 Messung der Lipid- und Apolipoprotein-Konzentrationen	26
2.3.5 Isolierung der Plasmaamino-säuren	27
2.3.6 Bestimmung der Tracer-Anreicherung und der Tracer/Tracee-Ratio	28
2.4 Modelling	29
3. Ergebnisse	32
3.1 Apolipoprotein-Konzentrationen und ApoE-Phänotypisierung	32
3.2 Isolierung der Apolipoproteine durch HPLC	34
3.3 Tracer/Tracee-Ratios: VLDL-ApoB, VLDL-ApoCIII, VLDL-ApoE3, LDL-ApoB	41
3.4 Kinetische Parameter: Fractional Catabolic Rate (FCR) und Produktionsrate	50
3.5 Ergebnisse hypertriglyceridämischer Proband Nr. 7	54

4. Diskussion	60
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	74
7. Anhang	83
7.1 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	83
7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	85
7.3 Lebenslauf	86
7.4 Danksagung	87

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Die Atherosklerose, insbesondere die atherosklerotischen Veränderungen an den Koronararterien mit ihren Folgen, Herzinfarkt und plötzlicher Herztod, stellt in den westlichen Industrienationen nach wie vor die häufigste Todesursache dar.

Seit Ende der 40er Jahre konnten durch prospektive epidemiologische Studien als entscheidende Risikofaktoren für eine erhöhte Morbidität und Mortalität degenerativer Herz-Kreislauferkrankungen Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, inhalatives Zigarettenrauchen, Adipositas, sowie familiäre Disposition identifiziert werden (Framingham Offspring Study).

In der Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenzstudie (GRIPS) konnte überdies gezeigt werden, dass der Erhöhung des LDL-Cholesterins noch vor allen anderen Risikofaktoren die größte Bedeutung als prädiktiver Wert zukommt.

Eine intensive Primär- und Sekundärprävention mit der Minimierung der beeinflussbaren Risikofaktoren steht damit im Mittelpunkt kausaler therapeutischer Maßnahmen.

Allgemeine Maßnahmen, wie Gewichtsnormalisierung, körperliches Training und Rauchverbot, müssen ergänzt werden durch eine optimale Einstellung einer Hyperlipoproteinämie, eines Diabetes und einer Hypertonie.

Bei der Identifizierung der einzelnen Schritte und Prozesse des Lipidstoffwechsels liegt ein besonderes Interesse darin, Möglichkeiten einer medikamentösen Beeinflussung des Lipidstoffwechsels aufzudecken.

So spielen bei der Behandlung der verschiedenen Hyperlipoproteinämien heute neben einer cholesterin- bzw. triglyceridsenkenden Diät lipidsenkende Medikamente (Cholesterinsyntheseenzymhemmer, Fibrate, Ionenaustauscherharze, Nikotinsäurederivate) eine große Rolle. Die Wirksamkeit der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, der sog. CSE-Hemmer (z. B. Simvastatin), durch eine Reduktion des Gesamt- und des LDL-Cholesterins konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Scandinavian-Simvastatin-Survival-Study, 1994; West-of-Scotland-Coronary-Prevention-Study, WOSCOPS, 1995; Cholesterol-And-Recurrent-Events-Study, CARE-Study, 1996).

Der Wirkmechanismus dieser Medikamenten-Gruppe besteht in der kompetitiven Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase, die β -Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A in Mevalonat umwandelt. Durch die verminderte Cholesterinbiosynthese kommt es zu einem Abfall des intrazellulären Cholesteringehaltes und damit zu einer Aktivierung der LDL-Rezeptor-Synthese und einer vermehrten Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Über diese LDL-Rezeptoren wird LDL vermehrt in die Zellen aufgenommen und damit der Anteil des Serumcholesterins deutlich gesenkt. Vermittelt wird die Interaktion zwischen Rezeptor und Lipoprotein in diesem Fall durch ApoB.

Das Wirkprinzip der CSE-Hemmer zeigt beispielhaft, dass den Apolipoproteinen eine entscheidende – auch klinisch nutzbare - Rolle im Lipidstoffwechsel zukommt. Dies impliziert gleichzeitig, dass gerade durch die in-vivo Beschreibung des Stoffwechsels der Apoproteine wichtige Mechanismen des Lipoprotein-Stoffwechsels charakterisiert werden können, die am Anfang weiterer klinischer Studien stehen können.

Der in-vivo-Stoffwechsel von ApolipoproteinB konnte bereits in einer Reihe von Studien beschrieben werden (Berman et al, 1978; Beltz et al, 1985; Cryer et al, 1986; Demant et al, 1988; 1991; 1994; 1996; Parhofer et al, 1991; 1996; 1999; 2000; Barrett et al, 1991; Packard et al, 1995; Millar et al, 1998). Auch der Stoffwechsel von Mutationen des ApoB100 (Trunkiertes ApoB, ApoB3500) wurde in vivo charakterisiert (Parhofer et al, 1992, 1996; Pietzsch et al, 1996).

Im Gegensatz dazu liegen zum in-vivo Stoffwechsel anderer Apolipoproteine, insbesondere zu ApoC und ApoE erst wenige detaillierte Untersuchungen vor (Patterson et al, 1991; Fredenrich et al, 1997; Millar et al, 1998; Mahley et al, 1999; Batal et al, 2000). Obwohl Assoziationen zwischen bestimmten ApoE-Phänotypen und Stoffwechselstörungen (z. B. Familiäre Dysbetalipoproteinämie bei ApoE-Phänotyp E2/2; Hypercholesterinämie bei ApoE-Phänotyp E3/4 oder E4/4), sowie zwischen Chylomikronämie-Syndromen und einem Mangel an ApolipoproteinCII bekannt sind, existieren nur wenige Studien, die den in-vivo-Stoffwechsel dieser Apolipoproteine ausreichend erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Metabolismus der VLDL-Apoproteine ApoB, ApoCIII und ApoE im Rahmen von Turn-over-Studien untersucht.

Damit sollte ein Beitrag geleistet werden, Mechanismen des Lipoproteinstoffwechsels durch die Charakterisierung des Metabolismus verschiedener Apolipoproteine zu verstehen.

1.2 Lipoproteine: Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften

Der Transport von exogenen und endogenen Lipiden im menschlichen Organismus erfolgt in Form von Lipoproteinen. Dabei handelt es sich um Microemulsionen, die als zentrale sog. Core-Lipide apolare Cholesterinester, Triglyceride und andere fettlösliche Stoffe (z. B. Vitamine) und als Hülle polare Phospholipide (Lecithin, Sphingomyelin), freies Cholesterin, Fettsäuren, Apolipoproteine und Kohlenhydrat-Ester enthalten. Die Apolipoproteine besitzen als Proteinkomponente der Lipoproteine neben der Stabilisierung der Lipidkomplexe spezifische Funktionen in Lipidtransport, Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Schlüsselenzyme des Lipidstoffwechsels, Rezeptorinteraktion, Interaktion zwischen Lipoproteinen etc.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften (Dichte, Löslichkeit, Ladung etc.) lassen sich die Lipoproteine in verschiedene **Klassen** einteilen. Mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge können die Lipoproteine nach ihrer Dichte in fünf Hauptklassen aufgetrennt werden: **Chylomikronen** ($d < 1,000 \text{ kg/l}$), **Very Low Density Lipoproteins (VLDL)**, $d < 1,006 \text{ kg/l}$), **Intermediate Density Lp (IDL)**, $d < 1,019 \text{ kg/l}$), **Low Density Lp (LDL)**, $d < 1,063 \text{ kg/l}$), **High Density Lp (HDL₂)**, $d < 1,125 \text{ kg/l}$ und **HDL₃**, $d < 1,210 \text{ kg/l}$) (siehe Tab.1.2.1, nach Kostner und März, 2001). Da Synthese und Abbau der Lipoproteine im wesentlichen durch ihre Proteinkomponente, die Apolipoproteine, vermittelt werden, können die Lipoproteine nach der Hauptkomponente ihres Proteinanteils in **Lipoprotein-Familien** (Alaupovic et al, 1972) eingeteilt werden. Dabei ist in den meisten Lipoproteinen nicht ausschließlich eine Apolipoproteinklasse zu finden, sondern viele unterschiedliche Kombinationen aus zwei oder mehr Apolipoprotein-Klassen. Damit existiert eine große Anzahl an Lipoproteinen, die sich in Lipid- und Proteinzusammensetzung, dem Lipid-Protein-Verhältnis und absolutem Gehalt an Apolipoproteinen unterscheiden (siehe Tab. 1.2.2 und 1.2.3, nach Kostner und März, 2001). Die Definierung nach der Apoproteinzusammensetzung spiegelt so nur eine Momentaufnahme wieder, da die Partikel durch fortlaufenden Austausch und Transfer von Lipiden und Apoproteinen, sowie durch enzymatische Veränderungen ständigen Modulationsvorgängen unterliegen.

Tab. 1.2.1 Eigenschaften der Plasmalipoproteine

Eigenschaften der Plasmalipoproteine

Lipoprotein	Größe (nm)	Dichte (kg/l)	Masse (MDa)	Konzentration (g/l)	
				Männer	Frauen
Chylomikronen	<10 ⁴	<1.000	<150	<0.1	<0.1
VLDL	50	<1.005	5-130	0.5-2.0	0.5-1.5
IDL	30	<1.019	3.50		
LDL	21	<1.063	2.50	2.0-3.5	2.0-3.0
Lp(a)	25	<1.090	5.50	0.01-0.5	0.01-0.5
HDL _E	12	<1.125	0.50	<0.05	<0.05
HDL ₂	10	<1.125	0.36	0.5-1.0	1.0-1.5
HDL ₃	8	<1.210	0.20	1.0-2.0	1.0-2.0
VHDL	7	<1.250	0.15	0.1-0.2	0.1-0.2

nach Kostner und März, 2001

Tab. 1.2.2 Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas

Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas

Elektrophorese	Ultrazentrifugation	Proteinanteil
U! Lipoprotein	HDL ₂ , HDL ₃	LpA-I:A-II, LpA-I, LpA:C, LpA:E
V-Lipoprotein	LDL	LpB
Prä-V-Lipoprotein	VLDL	LpB:C:E
Prä-V ₁ -Lipoprotein	HDL ₁	LpB:a = Lp(a)
Broad-V-Lipoprotein (floating pre-V)	VLDL/IDL	LpB:E:C

nach Kostner und März, 2001

Tab. 1.2.3 Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine

Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine

Lipoprotein	Protein	PL	FC	CE	TG
		Phospholipide	Freies Cholesterin	Cholesterinester	Triglyceride
in % der Lipoproteinmasse					
Chylomikronen	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
IDL	17	20	9	34	20
LDL	23	21	11	41	4
Lp(a)	34	18	9	36	3
HDL _E	35	34	10	20	1
HDL ₂	42	35	5	13	5
HDL ₃	56	23	3	15	3
VHDL	72	20	2	5	1

nach Kostner und März, 2001

1.3 Stoffwechsel der Lipoproteine

Im Stoffwechsel der Plasmalipoproteine werden ein exogenes, ein endogenes und ein reverses Cholesterintransportsystem unterschieden. Dabei werden über den exogenen Weg die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide transportiert, während der endogene Weg die Verstoffwechslung von Lipoproteinen hepatischen Ursprungs beschreibt. Der reverse Cholesterintransport dient dem Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber, dem einzigen Organ, über das Cholesterin ausgeschieden werden kann.

1.3.1 Der exogene Weg

Nach der Spaltung der mit der Nahrung aufgenommenen Triglyceride durch Magen- und Pancreaslipasen in Fettsäuren, Mono- und Diglyceride werden diese im Dünndarm in Form gemischter Mizellen resorbiert, die Gallensäuren, Phospholipide, Cholesterin, Diglyceride und dissoziierte Fettsäuren enthalten. Neu synthetisiertes ApoB48 und aus freien Fettsäuren und MAG synthetisierte Triglyceride sind in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) gespeichert und werden über einen MTPabhängigen Mechanismus in das ER-Lumen transportiert, dort zu **Chylomikronen** zusammengebaut und an den Golgi-Apparat abgegeben (Cartwright et al, 2000). Das in den Mucosazellen durch die ACAT nahezu vollständig veresterte Cholesterin wird mit den Phospholipiden und den Apoproteinen ApoAI und ApoAIV in die Chylomikronen eingebaut. Die naszierenden Chylomikronen werden an die Lymphe abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Erst nach ihrer Sekretion nehmen die Chylomikronen die Apoproteine ApoC und ApoE u. a. aus den HDL auf. Die Lipoproteinlipase spaltet mit ApoCII als Cofaktor die TG in freie Fettsäuren und V-MAG, die an Fettgewebe und Muskulatur abgegeben werden. Die Apoproteine ApoCIII und ApoCI verhindern durch eine Verlegung der Bindungsstelle des ApoE eine vorzeitige Entfernung der Partikel aus der Zirkulation. Erst nachdem die Chylomikronen durch enzymatische Veränderungen und sukzessive Abgabe der Apoproteine eine Größe erreicht haben, die eine Passage des fenestrierten Endothels der Lebersinusoide ermöglichen, können die entstandenen **Chylomikronen-Remnants** über rezeptorvermittelte Endozytose (LDL-R, LRP) oder nach Sequestration im Disse'schen Raum in die Leber aufgenommen werden (Cooper, 1997).

1.3.2 Der endogene Weg

Über den endogenen Weg werden die peripheren Gewebe mit Triglyceriden und Cholesterin versorgt. Am Beginn steht die VLDL-Produktion in der Leber. Das im rauen ER synthetisierte ApoB100 wird in Form eines VLDL-Precursor-Partikels in das ER-Lumen abgegeben und dort mit TG-reichen Partikeln, die ihrerseits aus dem glatten ER stammen, zu **VLDL** komplexiert (Cartwright et al, 2000). Dieser TG-Transfer wird mutmaßlich von einem Microsomalen Transferprotein (MTP) katalysiert (Millar et al, 1998). Nach Modifizierung der neu gebildeten VLDL durch Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, sowie durch Ausbildung von Disulfidbrücken werden die naszierenden VLDL in sekretorischen Vesikeln in den Disse'schen Raum sezerniert. Abhängig von der Beladung mit Triglyceriden werden große, triglyceridreiche und weniger dichte VLDL₁, sowie dichtere, triglyceridärmere VLDL₂ in den Hepatozyten gebildet (Millar et al, 1998). Neben je einem Molekül ApoB100 enthalten die neu gebildeten VLDL auch einen geringen Anteil an ApoE und ApoC. Im weiteren Verlauf nehmen die VLDL zusätzlich ApoE- und ApoC-Moleküle auf, die zum einen als Cofaktoren der LPL die Hydrolyse der Triglyceride aktivieren bzw. inhibieren (ApoCII bzw. ApoCIII), zum anderen aber eine vorzeitige Entfernung aus der Zirkulation verhindern (ApoCI, ApoCIII). Durch schrittweise Hydrolyse der TG entstehen sogenannte **VLDL-Remnants**, die reich an Cholesterinestern und ApoE sind. Diese VLDL-Remnants können entweder über den LDL-R direkt in die Leber aufgenommen oder schrittweise über IDL in LDL umgewandelt werden. Darüber hinaus nimmt man heute für ca. 37% einen "Kurzschluß-Weg" an, der eine direkte Konversion von VLDL zu LDL beschreibt (Beltz et al, 1985; Parhofer et al, 1991). Daneben wird auch eine primäre hepatische Synthese und Sekretion von IDL und LDL ins Plasma diskutiert (Parhofer et al, 1991; Demant et al, 1996). Auf jeder Stufe der Delipidierungskaskade von VLDL zu LDL können die Partikel aus der Zirkulation entfernt werden. Während dies bei den VLDL-Subfraktionen nahezu ausschließlich über die Interaktion zwischen Apo-E und dem LDL-Rezeptor geschieht, ist in der LDL-Fraktion ApoB100 als alleinige Proteinkomponente einziger Ligand des LDL-R.

Über den LDL-Rezeptor gelangen ca. zwei Drittel der LDL in die Leber, sowie in periphere Gewebe, in denen Cholesterin als Membranbaustein oder zur Synthese von Steroidhormonen oder Vitamin D benötigt wird. Es können verschiedene LDL-Subfraktionen unterschieden werden, die sich in Größe, Dichte und Affinität zum LDL-R unterscheiden. Die kleineren und dichteren Moleküle, die leichter oxidiert und schlechter aus der Zirkulation eliminiert werden können, besitzen dabei die größere atherogene Potenz (Krauss et al, 1982; Austin et al, 1988; Krauss et al, 1994). Der LDL-Rezeptor-Zyklus unterliegt einer Feedback-Regulation, die die Expression des Rezeptors an den zellulären Cholesteringehalt anpasst. Neuere Untersuchungen deuten auch darauf hin, dass der Funktionszustand des LDL-

Rezeptors auch die Sekretion der ApoB-haltigen Lipoproteine aus der Leber beeinflussen kann (Twisk et al, 2000). Daneben existieren auch rezeptorunabhängige Mechanismen zur Aufnahme in die Skelettmuskulatur und in das Gehirn. Scavenger-Rezeptoren an der Oberfläche von Macrophagen und Zellen des RNS-Systems spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von durch Oxidation, Acetylierung oder Konjugierung modifizierter LDL (Brown et al, 1997). Durch intrazelluläre Ablagerung können so Macrophagen zu sog. Schaumzellen transformiert werden und stehen damit am Anfang der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen.

1.3.3 Der reverse Cholesterintransport

Die Ausscheidung von Cholesterin aus dem Organismus ist neben Abschilferungen über Epithelien nur über die Leber möglich. Dazu muss Cholesterin aus peripheren Geweben zurück zur Leber transportiert werden. Dieser Mechanismus ist eng mit dem Metabolismus der **HDL** verbunden.

Die in den Zellen der Darmmucosa gebildeten HDL-Präkursoren enthalten vornehmlich die Apoproteine ApoA1 und AIV. Den naszierenden HDL-Partikeln wird aus den Membranen nicht hepatischer Zellen freies Cholesterin übertragen, das durch die LCAT in den HDL verestert wird. Es entstehen zunächst Partikel des Dichtebereichs der HDL₃, aus denen durch weitere Cholesterinaufnahme weniger dichte HDL₂ gebildet werden können. Nach der Anreicherung mit anderen Apoproteinen, vor allem ApoE, können die HDL entweder über die Leber aus dem Blutkreislauf entfernt werden oder geben über das CETP Cholesterinester teilweise im Austausch gegen Triglyceride an ApoB-haltige Lipoproteine ab. Über diesen Recycling-Mechanismus können die Cholesterinester in den LDL-Stoffwechsel eingeschleust und wieder zur Leber oder zu peripheren Geweben transportiert werden. Zu einem kleinen Teil werden Cholesterinester über ApoE-haltige HDL (**HDL_E**) rezeptorvermittelt in die Leber aufgenommen. Über die Leber wird Cholesterin entweder direkt oder nach Umbau zu Gallensäuren über die Galle ausgeschieden.

1.4 Apolipoproteine

Apolipoproteine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, deren Funktion die Stabilisierung von Lipidemulsionen und der Transport von Lipiden ist. Als Cofaktoren beeinflussen sie durch Aktivierung bzw. Inhibierung von lipolytischen Enzymen das Schicksal der Lipoproteine. Durch die Bindung an membranständige Rezeptoren sind die Apoproteine zudem wesentlich an der Aufnahme und Sezernierung der Lipoproteine beteiligt. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 6,5kDa und 550kDa und liegen im Nüchtern-Plasma in Konzentrationen zwischen 50mg/l bis über 1000mg/l vor. Die 15 bisher identifizierten Apolipoproteine lassen sich in **10 Klassen** einteilen (**A bis J, a**). Die Apoproteinklassen und ihre Funktionen sind zusammenfassend in Tab. 1.4 (nach Kostner und März, 2001) dargestellt. Auf die in der Arbeit beschriebenen Apolipoproteine B, C und E soll noch gesondert eingegangen werden.

1.4.1 ApoB100 und ApoB48

Apolipoprotein B100 besitzt mit 550kDa das größte Molekulargewicht unter allen Proteinen und liegt im Plasma in Konzentrationen zwischen 700 bis 900mg/l vor. ApoB stabilisiert vor allem die Lipoproteine der Dichteklasse $d < 1,063 \text{ kg/l}$ (VLDL, IDL, LDL). Es ist das Hauptprotein der LDL. Daneben kommt ApoB auch in einem höheren Dichtebereich als Lp(a) vor, einem LDL-artigen Lipoprotein mit einem zusätzlichen Apoprotein, dem Apo(a). ApoB100 und ApoB48 sind Produkte eines einzigen Gens. Die 2152 Aminosäuren umfassende Sequenz des ApoB48 entspricht dabei dem aminoterminalen Ende des ApoB100. Da ApoB48 ausschließlich in der Dünndarmmucosa synthetisiert wird, kommt es nur in Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants vor und dient damit dem Transport von exogenen Lipiden. Die Sekretion von Triglyceriden und Cholesterin aus der Leber und aus dem Dünndarm ins Plasma wird durch ApoB100 vermittelt. Da sich die rezeptorbindende Domäne des ApoB am carboxyterminalen Bereich des Moleküls befindet, ist nur ApoB100 in der Lage, mit dem LDL-Rezeptor in Interaktion zu treten.

1.4.2 ApoCI, ApoCII und ApoCIII

In der Klasse der Apolipoproteine C sind drei Vertreter bekannt, ApoCI, ApoCII und ApoCIII. ApoCIII existiert in drei bis vier Isoformen, die sich im Gehalt an Neuraminsäure unterscheiden. Die Apolipoproteine CI - CIII besitzen die geringste molekulare Masse unter den Apoproteinen (CI: 6,5kDa, CII: 8,8kDa, CIII:8,9kDa) und liegen im Plasma in Konzentrationen zwischen 50 bis 120mg/l vor. Die ApoC's kommen vornehmlich in den triglyceridreichen Lipoproteinen (Chylomikronen, VLDL und IDL) vor, in die sie aus dem Pool der HDL aufgenommen werden können (Kostner et März, 2001).

Sie gelten als die Effektoren der Lipoproteinlipase, die die Hydrolyse exogener Lipide vermittelt. Dieses Enzym benötigt für seine lipolytische Aktivität ApoCII als Cofaktor, wohingegen ApoCIII die Verstoffwechslung triglyceridreicher Lipoproteine durch direkte Inhibition der Lipoproteinlipase beeinflusst. Die Aufnahme von Chylomikronen- und VLDL-Remnants geschieht unter anderem über eine Interaktion zwischen ApoE und membranständigen Rezeptoren. Um eine vorzeitige Entfernung der triglyceridreichen Lipoproteine aus der Zirkulation zu verhindern und eine Konversion zu den dichteren Lipoprotein-Klassen (IDL, LDL) zu ermöglichen, inhibiert ApoCIII, ebenso wie ApoCI zusätzlich die Bindung an Rezeptoren der Leber, indem sie die rezeptorbindende Domäne des ApoE blockieren. So werden die Lipoproteine erst nach Prozessierung durch die entsprechenden Enzyme und Abladen der Triglyceride in die Leber aufgenommen.

Darüber hinaus scheint ApoCIII auch direkt die Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber zu hemmen und reguliert somit als Bestandteil nahezu aller Lipoproteinfraktionen über unterschiedliche Mechanismen die Clearance und Lipolyse exogener und endogener Lipide.

1.4.3 ApoE

Eine bedeutende Rolle im Lipidstoffwechsel spielt das ApolipoproteinE, das vor allem in Lipoproteinen der Dichte $d < 1,063 \text{ kg/l}$ (Chylomikronen, VLDL, IDL) zu finden ist. Es kommt jedoch auch in HDL vor und bildet dort als Komplex mit ApoAI und anderen Apoproteinen eigene Lipoprotein-Klassen (HDL_E , LpE). ApoE wird zu 90% in der Leber synthetisiert, daneben aber auch in Monozyten, Macrophagen und Astrogliazellen im peripheren und zentralen Nervensystem. Das Protein besteht aus einer Sequenz von 299 Aminosäuren (Rall et al, 1982). Auf dem Genlocus des ApoE sind drei Allele bekannt, Y2, Y3 und Y4. Vom Wildtyp e3 unterscheiden sich e2 bzw. e4 durch den Austausch von jeweils einer Aminosäure an den Positionen 112 und 158 (e2: Cys¹¹², Cys¹⁵⁸; e3: Cys¹¹², Arg¹⁵⁸; e4: Arg¹¹², Arg¹⁵⁸) (Utermann et al, 1984; Assmann et al, 1984). Durch codominante Vererbung existieren dadurch drei homozygote (E3/3, E2/2, E4/4) und drei heterozygote Isoformen (E3/4, E2/3, E4/2), die durch posttranslationale Modifikation mit Neuraminsäure zusätzlich verändert werden. E3/3 gilt als die Normalvariante und ist unter kaukasischen Bevölkerungsgruppen in ca. 54% vertreten (Kostner und März, 2001).

ApoE ist Ligand vieler Lipoprotein-Rezeptoren (z. B. LDL-R, LRP, VLDL-R). Dabei bindet ApoE mit einer 10fach höheren Affinität als ApoB100 an den LDL-Rezeptor und vermittelt so den Abbau triglyceridreicher Partikel (VLDL, Chylomikronen). Durch direkte Inhibition, sowie durch Verdrängung und Maskierung von ApoCII, dem Cofaktor der LPL, beeinflusst ApoE die Lipolyse triglyceridreicher Lipoproteine. Auch scheint ApoE die hepatische VLDL- und TG-Produktion direkt zu stimulieren (Mahley et al, 1999) und den Zusammenbau und/oder die Sekretion ApoB100-haltiger Lipoproteine zu beeinflussen (Demant et al, 1991).

Als HDL_E ist ApoE zudem an der Mobilisierung von freiem Cholesterin aus nicht hepatischen Zellen, z. B. Macrophagen, und an der Aufnahme von HDL in die Leber beteiligt (reverser Cholesterintransport).

Zusätzlich werden ApoE Funktionen außerhalb des Lipoproteinstoffwechsels zugeschrieben: Modulation der zellulären Immunantwort, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Regulation der Steroidhormonsynthese. Eine weitere Rolle kommt ApoE im zentralen und peripheren Nervensystem durch Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung von Neuronen zu. Durch den Abbau neurotoxischer Amyloid-Peptide und von Plaque-Komplexen scheint ApoE in der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit eine zentrale Rolle zu spielen. Defiziente Reparations- und Protektionsmechanismen bei ApoE4-Phänotypen könnten Ursache für Neurodegenerationen sein, die für die Alzheimer'sche Krankheit pathognomonisch sind (Mahley et al, 1999).

Die Bedeutung des ApolipoproteinE geht damit weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus.

Tab. 1.4 Apolipoproteine des menschlichen Plasmas

Apolipoproteine des menschlichen Plasmas

Apoprotein	Dichte- klasse	Masse (kDa)	Konzentration (mg/dl)	Funktion
A-I	HDL	28.5	1200-1400	Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptoren, Prostazyklinstabilisierung
A-II	HDL	17	350-500	Aktivierung der hepatischen Lipase ?
A-IV	HDL, CM	46	<50	TG-Stoffwechsel, Aktivierung der LCAT
B-100	VLDL, LDL	550	700-900	Sekretion v. TG u. Chol aus Leber und Dünndarm; Strukturprotein, Aktivierung der LysolecithinAcyltransferase Bindung an B/E-Rezeptor (LDL-R),
B-48	CM, V-VLDL	265	<50	Resorption von Lipiden u. lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung
C-I	CM, VLDL	6.5	50-80	Unterdrückung d. Bindung naszierender Lipoproteine an den LDL-R und an LRP, Aktivierung der LCAT
C-II	CM, VLDL	8.8	30-70	Aktivierung der Lipoproteinlipase
C-III	CM, VLDL	8.9	100-120	Inhibierung der Lipoproteinlipase
D (A-III)	HDL ₃	29	80-100	Aktivierung u. Stabilisierung der LCAT
E	CM, VLDL, HDL _E	34	30-50	Ligand für LDL- und E-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen
F	HDL	30	<50	unbekannt
G	VLDL	72	<50	unbekannt
H	CM, D>1.21kg/l	55	150-300	unbekannt
(a)	Lp(a)	350-900	variabel	Unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse
J	HDL ₂ , HDL ₃	70	70-200	unbekannt

nach Kostner und März, 2001

1.5 Vorbemerkungen zur Methodik

Zur Beschreibung und Quantifizierung des in-vivo Stoffwechsels von Apolipoproteinen sind verschiedene Methoden und Ansätze entwickelt worden.

Für Steady-State-in-vivo Untersuchungen zum Apolipoprotein-Metabolismus kommt grundsätzlich die Verwendung von exogenen oder endogenen Tracern in Betracht. Bei der exogenen Methodik wird das interessierende Lipoprotein aus dem Plasma gewonnen, außerhalb des Körpers präpariert - meist radioaktiv jodiniert - und wieder in den Organismus reinjiziert. Endogene Tracer werden in Form von Vorläufersubstanzen in den Stoffwechsel eingeschleust.

An einen idealen Tracer werden folgende Anforderungen gestellt: einfache und genaue Erfäßbarkeit durch den Untersucher, keine Störung des Systems und des Steady-States durch Einschleusung des Tracers, sowie identische kinetische Daten von Tracer und Tracee (Barrett and Foster, 1996).

Exogene Tracer bieten den Vorteil, dass die interessierende Substanz oder Fraktion direkt in den Kreislauf eingeschleust werden kann. Durch den Abfall der Radioaktivität der markierten Lipoproteinfraktion und dem Auftreten der Markierung in anderen Fraktionen können kinetische Daten abgeleitet werden (Beltz et al, 1985; Barrett et al, 1991; Packard et al, 1995). Durch die Isolation und Markierung können die Lipoproteine jedoch soweit modifiziert werden, daß ihr Stoffwechselverhalten nicht mehr dem unmarkierten Zustand entspricht. Neben einer ungleichen Markierung liegt darin sicher der große Nachteil dieses Verfahrens (Beltz et al, 1990; Fisher et al, 1991).

Durch den direkten Einbau eines endogenen Tracers über tatsächliche Stoffwechselwege können Rückschlüsse über Synthese und Sekretion bestimmter Proteine gewonnen werden, ohne sie in ihrer biologischen Funktionsfähigkeit einzuschränken. Dies schließt jedoch auch mit ein, dass keine genaue Unterscheidung zwischen dem Stoffwechsel des Precursors und dem sehr langsam verstoffwechselter Partikel gemacht werden kann (Beltz et al, 1990; Demant et al, 1996; Barrett et al, 1996). Dieses Problem des Tracer-Recyclings spielt vor allem bei Untersuchungen zum LDL- und HDL-Stoffwechsel eine Rolle.

Die Benutzung endogener Tracer hat sich vor allem für Untersuchungen zum VLDL-Stoffwechsel etabliert. Dabei stehen zur Tracermarkierung zwei Alternativen zur Wahl: radioaktive und mit stabilen Isotopen markierte Tracer. Nicht zuletzt aufgrund ethischer Bedenken bei der Verwendung radioaktiver Substanzen werden seit 1986 (Cryer et al, 1986) stabile Isotope zur Markierung von verschiedenen Trägersubstanzen eingesetzt, meist ^{15}N -, ^{13}C -, deuteriertes Glycin oder Aminosäuren (Glycin, Leucin, Valin, Lysin, Arginin oder Phenylalanin). Es konnte gezeigt werden, dass die Art der Aminosäure dabei keinen Einfluß auf die kinetischen Parameter hat (Lichtenstein et al, 1990; Parhofer et al, 1991).

Idealerweise werden Aminosäuren verwendet, die eine hohe Frequenz in der Aminosäure-Sequenz des untersuchten Proteins besitzen. Auch verschiedene Applikationsarten, als Bolus-Injektion oder Primed-constant-Infusion, zeigten keine signifikanten Unterschiede (Parhofer et al, 1991; Demant et al, 1996). Obwohl nur ein minimaler Prozentsatz des injizierten Tracers tatsächlich in das untersuchte Protein eingebaut wird, sind relativ kleine Dosierungen ausreichend, um signifikante Anreicherungsdaten messen zu können (Demant et al, 1996).

Die Anreicherung der Tracer-Aminosäuren kann durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS) bestimmt werden. Da stabile Isotope im menschlichen Organismus auch natürlich vorkommen und die Masse der Tracer nicht vernachlässigbar ist, müssen die Anreicherungsdaten in Tracer/Tracee-Ratios umgewandelt werden, die ein Maß für das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Aminosäuren darstellen (Cobelli et al, 1987; Cobelli et al, 1992).

Voraussetzung dafür ist, dass alle Proteine homogen und in gleichem Ausmaß markiert werden. Die Traceranreicherung im hepatocellulären Pool (amino-acyl-tRNA) wird als parallel zur Anreicherung im Plasma, bzw. in den Plasma-Aminosäuren angesehen. Damit stellt die Bestimmung der Tracer-Anreicherung im Pool der freien Plasma-Aminosäuren die Grundlage zur Quantifizierung der hepatischen Apoprotein-Produktion dar. Gleichzeitig wird ein Steady-State postuliert, in dem Produktion und Abbau der Apoproteine gleich sind.

Zur Quantifizierung von Stoffwechseldaten gilt die Verwendung eines Multi-Kompartiment-Modells als der Gold-Standard. Im Vergleich zu anderen Ansätzen (z.B. Lineare Regressionsanalyse) ist die Beschreibung über eine Serie von Differentialgleichungen als Basis für ein Multi-Kompartiment-Modell ein valides Modell zur Stoffwechsel-Analyse (Parhofer et al, 1991; Barrett et al, 1996). Die einzelnen Kompartimente, die durch Stoffwechselwege verknüpft sind, besitzen nicht zwingend ein physiologisches Korrelat, sondern zeigen ein theoretisches Modell, in dem die erhobenen Parameter durch ein mathematisches Modell mit Kenntnissen über tatsächliche Stoffwechsel-Vorgänge verknüpft werden. Die Konstruktion eines Multi-Kompartiment-Modells setzt jedoch eine Vereinbarkeit von hypothetischen Modelstrukturen mit tatsächlichen physiologischen Gegebenheiten voraus (Barrett and Foster, 1996). Zur Abschätzung der aminoacyl-tRNA-Anreicherung aus den Plasmaamino-säuren kann entweder ein eigenes Submodell (Demant et al, 1996) oder alternativ eine Forcing-Funktion (Foster et al, 1979) verwendet werden.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Für in-vivo Untersuchungen zum Lipoproteinstoffwechsel gilt die Verwendung endogener Tracer, z. B. mit stabilen Isotopen markierte Aminosäuren, als Methode der Wahl. Die Interpretation der Anreicherungsdaten zur Bestimmung von Stoffwechselparametern sollte dabei durch ein Multi-Kompartiment-Modell erfolgen.

Während so der Stoffwechsel des ApoB100 relativ gut erforscht ist, liegen zu den anderen Apoprotein-Klassen bisher erst wenige Daten vor. Ein Hauptproblem bei der Untersuchung der Apoproteine C und E liegt vor allem in der Isolierung der einzelnen Apoprotein-Klassen.

Im Rahmen einer Turn-over-Studie sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Erstens sollte gezeigt werden, ob aus durch Ultrazentrifugation isolierten Lipoproteinfractionen die Apolipoproteine ApoE und ApoC durch HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) isoliert werden können.

Zweitens sollte untersucht werden, ob unter der Verwendung von mit Deuterium markiertem Leucin (D_3 -Leucin) als Tracer Stoffwechselparameter (Produktionsraten, Abbauraten) von VLDL-ApoCIII und -ApoE bestimmt werden können. Weiterhin sollten die so erhobenen Stoffwechseldaten mit gleichzeitig bestimmten VLDL-ApoB-Parametern verglichen werden.

Drittens sollte zusätzlich zu der Untersuchung von 6 normolipämischen Probanden exemplarisch bei einem hypertriglyceridämischen Probanden evaluiert werden, ob bei erhöhten Triglyceridspiegeln für die vorliegende Fragestellung grundsätzlich der gleiche Untersuchungsansatz verwendet werden kann.

2. Methodik

2.1 Probanden

An der Studie nahmen sieben männliche Probanden, ohne chronische Erkrankungen oder regelmäßige Medikamenten- oder Hormoneinnahme (Alter 27.2 +/- 2.61 Jahre; Body-Mass-Index (BMI) 24.3 +/- 1.8 kg/m²) teil.

Während des Untersuchungszeitraumes standen die Probanden unter keiner speziellen Diät. Zur klinischen Charakterisierung der Probanden wurde im Nüchternplasma der Lipidstatus durch Bestimmung des Gesamtcholesterins (Chol), der Triglyceride (TG), des LDL- und HDL-Cholesterins erfasst (Tab. 2.1). Die Werte der Probanden 1 bis 6 lagen dabei allesamt im Normalbereich (Chol<200mg/dl; TG<180mg/dl; LDL<150mg/dl; HDL>35mg/dl).

Bei Proband Nr. 7 (Tab. 2.2) lagen die Nüchtern-TG-Werte (463mg/dl) deutlich über, LDL- und HDL-Cholesterin (LDL: 75mg/dl; HDL: 23mg/dl) deutlich unter dem Normbereich. Mit der Untersuchung dieses Probanden mit einem hypertriglyceridämischen Lipidprofil sollte ermittelt werden, ob sich bei erhöhten bzw. erniedrigten Plasmalipidspiegeln methodische Unterschiede in der Erfassung des Apolipoprotein-Stoffwechsels zeigen.

Tab. 2.1 Probanden Nr. 1 - 6

Probanden - Charakterisierung

Proband Nr.	Alter (Jahre)	BMI (kg/m²)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
1	20	24.2	243	127	144	74
2	26	22.8	194	79	128	51
3	28	24.8	176	65	113	50
4	29	25.6	188	110	123	43
5	23	21.6	189	71	131	44
6	37	26.5	195	168	126	36
MW	27.2	24.3	197.5	103.3	127.5	49.67
SD	2.61	1.8	10.42	17.77	4.55	5.86

Tab. 2.2 Proband Nr. 7

Proband Nr.	Alter (Jahre)	BMI (kg/m²)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
7	22	26.9	172	463	75	23

2.2 Studienprotokoll

Die Probanden wurden 9¹/₂ Stunden nach der letzten Mahlzeit stationär in die Klinik aufgenommen und in eine Unterarmvene ein intravenöser Zugang gelegt, über den im folgenden die einzelnen Blutabnahmen erfolgten. Bei Versuchsbeginn waren die Probanden seit 10 Stunden nüchtern.

In einem Bolus wurde den Probanden in die V. cubitalis des gegenseitigen Armes D₃-Leucin (5mg/kg*KG), gelöst in 20ml NaCl injiziert.

Über einen Zeitraum von 16h wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils ca. 10ml Vollblut abgenommen: vor Tracer-Applikation (Proben 1-3), dann zunächst in 10min Abständen (Proben Nr. 4-9), dann nach jeweils 30min (Nr. 10, 11), darauf im stündlichen Abstand (Nr. 12-15) und schließlich alle 2h (Nr. 16-20). Die letzten drei Blutabnahmen (Nr. 21-23) erfolgten nach Entlassung aus der Klinik ambulant nach einem Zeitraum von 4 bis 10h (Nr.21), bzw. an den beiden darauffolgenden Tagen als morgendliche Nüchternblutabnahmen. Zum Zeitpunkt der 21. Blutabnahme waren die Probanden nicht nüchtern.

Die Gesamtstudiendauer mit Erfassung von 23 Messpunkten betrug 59 bis 62h.

Zur Bestimmung des aktuellen Lipidstatus (Gesamtcholesterin, Triglyceride, LDL, HDL), sowie zur Messung der Gesamtproteinkonzentration und der ApoB- und ApoE-Konzentrationen wurden zum Zeitpunkt der Proben Nr. 3, 15, 20 und 23 zusätzlich 10ml Vollblut abgenommen.

2.3 Materialien, technische Ausstattung und analytische Verfahren

2.3.1 Endogener Tracer

[5,5,5-D₃]L-Leucin (d₃-Leu, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)

Vor der intravenösen Injektion wurde der Tracer in physiologischer Kochsalz-Lösung gelöst und steril filtriert.

2.3.2 Isolierung der Lipoproteinfraktionen

a) Technische Ausstattung

- * Zentrifuge, Rotixa/K Typ 7202, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, D
- * Ultrazentrifuge, Optima-XL70-Ultracentrifuge, Beckman-Instruments, Palo Alto, CA, USA
- * Festwinkel-Rotor, Typ 50.4, Beckman-Instruments, München, D

b) Materialien

- * Dichte-Lösungen

1.006-Solution: NaCl (58.44g/mol), Merck (1.06404), Darmstadt, D
EDTA, Titriplex III, C₁₀H₁₄N₂Na₂*2H₂O, Merck (1.08418)

11.04g NaCl + 0.3772g EDTA auf 1l aqua bid.

1.063-Solution: KBr pro analysi (119.01g/mol), Merck (1.04905)

20.193g KBr auf 250ml 1.006-Solution

- * Quick-Seal-Röhrchen (Beckman-Instruments, Fullerton, CA, USA)

c) Analytische Verfahren

Das Plasma wurde durch Zentrifugation (3000U/min, 10min) und Aspiration von den korpuskulären Blutbestandteilen abgetrennt.

Durch präparative Ultrazentrifugation in einem Festwinkel-Rotor bei 45000U/min über 20h wurde aus 4ml Plasma bei Eigendichte die VLDL-Fraktion (d<1.006g/ml) isoliert. Zur Auffüllung der Proben wurde EDTA-Kochsalzlösung derselben Dichte verwendet. Die LDL-Fraktion (d=1.006-1.063g/ml) und die HDL-Fraktion (d>1.063g/ml) wurden nach Einstellung der entsprechenden Dichten durch Zusatz von KBr weiter durch sequentielle

Ultrazentrifugation bei 140000*g, 5°C über 20 bzw. 48h abgetrennt. Die flottierenden Lipoproteinfraktionen wurden durch Schneiden der Quick-Seal-Röhrchen abgenommen.

Da die IDL-Fraktion (d=1.006-1.019g/ml) in dieser Studie nicht gesondert untersucht werden sollte, und die Zuweisung zur LDL-Fraktion keine signifikante Veränderung der untersuchten Parameter nach sich zieht, wurde diese Fraktion nicht separat isoliert.

2.3.3 Isolation der Apolipoproteine

a) Technische Ausstattung

- * Zentrifuge, Rotixa/K Typ 7202, Hettich- Zentrifugen, Tuttlingen, D
- * Tischzentrifuge 3200, Eppendorf, Hamburg, D
- * HPLC (High-Pressure-Liquid-Chromatographie),
System Gold™ (Beckman-Instruments, München, D)
 - Hochdruckgradienten-Pumpe 126
 - Detektor 168
 - Beckman-System-Gold Software
 - Säule: Aquapore RP-300, 7 micron, 220*4.6mm,
Kontron Analytic, Foster-City, CA, USA
 - Wellenlänge: λ = 225nm
 - Flow: 1ml/min
 - Gradient: Acetonitril/Phosphatpuffer:

0.35/0.65 -> 0.50/0.50	über 40min
0.50/0.50	über 10min
0.50/0.50 -> 0.35/0.65	über 5min
Gesamtlaufzeit:	55min
- * Fraktionssammler: Pharmacia LKB*Frac100, Pharmacia Biosystems, Freiburg, D
- * Lyophilisator Delta I, Christ Service, Osterode/Aichach, D
- * Heizer, Typ 2104DA, Gebr. Liebisch, Bielefeld, D
- * Vakuumkonzentrator mit Kühlfalle, Savant-Instruments Inc., Framingdale, NY, USA
 - Speed Vac[®] Plus AR, SC110AR
 - Refrigerated Vapor Trap, RVT100
- * Vakuumpumpe: RS-2, vacUUbrand, Brand GmbH+Co, Wertheim/Main, D

b) Materialien

- * zur Delipidierung: Äther/Ethanol 1:3 (vol/vol)
 - Diethylether pro analysi, C₄H₁₀O (74.12g/mol), Merck (1.00921)
 - Ethanol 96% vergällt mit Ethylmethylketon,
Apotheke der Universitätsklinik Großhadern (539764), D

* Probenpräparation für HPLC

DTT-Puffer: 0.012g Tris + 4.805 Harnstoff auf 10ml HCl (pH=8,6)

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, $C_4H_{11}NO_3$ (121.14g/mol), Merck (1.08382)
- Salzsäure, HCl (36.46g/mol), Merck (1.00317)
- Urea, CH_4N_2O (60.1g/mol), Serva (24524), Boehringer, Ingelheim, D
- Natronlauge, cNaOH 1N, Merck (1.09137)

DTT-Lösung: 1.54mg DL-DTT in 1ml DTT-Puffer

- DL-DTT (DL-Dithiothreitol), $C_4H_{10}O_2S_2$, Sigma-Chemical (D-5545), St. Louis, MO, USA

Phosphatpuffer: 31.202g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ auf 2 l aqua bid. (pH=2,5)

- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat reinst, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (156.01g/mol), Merck (1.06345)
- ortho-Phosphorsäure 85% reinst, H_3PO_4 (98.00g/mol), Merck (1.00563)

Acetonitril gradient grade für die Chromatographie, LiChrosolv, CH_3CN (41.05g/mol), Merck (1.00030)

* zur ApoB-Fällung

Diisopropylether 98%, $[(CH_3)_2CH]_2O$, Sigma Aldrich, D

* zur Dialysierung

Visking dialysis tubing 20/32, diameter 16mm, Porengröße 25 Å
Serva (44110), Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D

* für die Hydrolyse

Salzsäure rauchend 37%, HCl (36.46g/mol), Merck (1.00317)

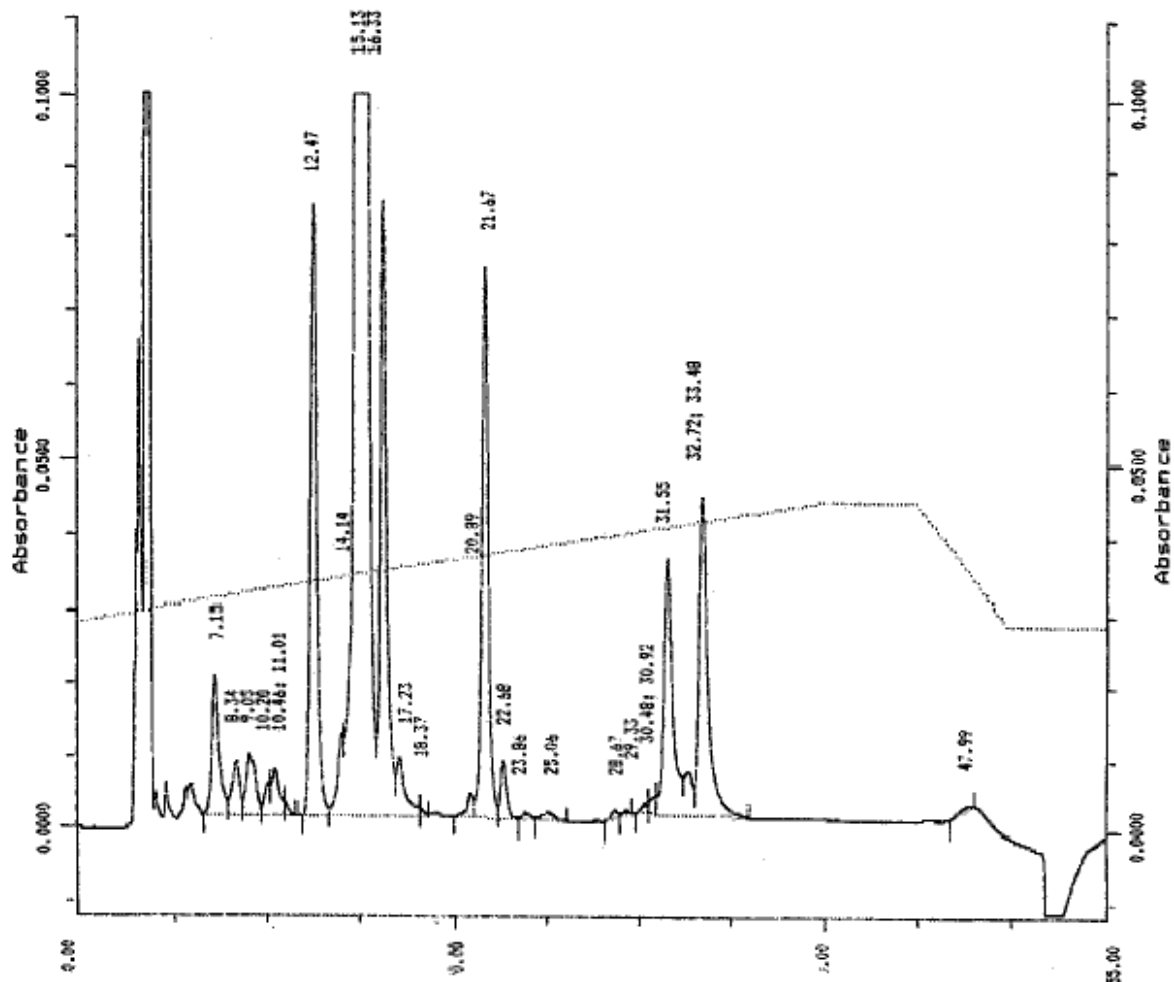
Wärmeleitflüssigkeit: CryoCool SCC1, Savant-Instruments, Inc., NY, USA

c) Analytische Verfahren

1000µl des durch Ultrazentrifugation gewonnenen VLDL wurden mit Äther/Ethanol 1:3(vol/vol) über 24h delipidiert, zentrifugiert, ein weiteres Mal delipidiert, und nach abschließender Zentrifugation der Überstand abgekippt. Nach Trocknung der Proben und Lösung in 30µl DTT-Lösung erfolgte nach Zusatz von 200µl Phosphatpuffer die Auftrennung der Apolipoproteinfraktionen ApoCI, ApoCII, ApoCIII und ApoE via reversed-phase HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) über einen Acetonitril/Phosphat-Gradienten (0.35/0.65 -> 0.50/0.50 in 40min). Die Peaks waren anhand von Referenzproteinen (reine Apoproteine) identifiziert worden.

Die Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch den Lauf einer VLDL-Fraktion bei einem Probanden mit Phänotyp E3/E4 (Proband Nr.1). Im zeitlichen Verlauf treten dort nach den spezifischen Retentionszeiten nacheinander die Apoproteine ApoCI, ApoCIII, ApoCII, ApoE4 und ApoE3 auf.

Abb. 2.3 HPLC-Lauf Proband Nr. 1 (ApoE-Phänotyp E3/E4)



Die den Peaks entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, über 5h dialysiert und in gefrorenem Zustand lyophilisiert. Nach Hydrolyse mit 200µl 12N HCl bei 110°C über 18h wurde die Salzsäure in einem Vakuumkonzentrator (Speed-Vac) über 3h wieder verdampft.

Die ApoE-Phänotypisierung erfolgte durch Isoelektrofokussierung (Menzel et al, 1983; Havekes et al, 1987; Steinmetz, 1991).

Nach Ausfällung des ApolipoproteinB aus der VLDL- und LDL-Fraktion mit Butanol-Isopropyläther wurde ApoB durch Präzipitation isoliert (Egusa et al, 1983; Klein et al, 1984), unter Stickstoff getrocknet, in 12N HCl bei 110°C über 16h hydrolysiert und die Salzsäure wie oben beschrieben verdampft.

2.3.4 Messung der Lipid- und Apolipoprotein-Konzentrationen

a) Technische Ausstattung

- * Epos Analyzer 5060, Eppendorf, Hamburg, D
- * Nephelometer 100 Analyzer, Behring Diagnostika, Behringwerke AG, Schwalbach, D
- * UV/Visible Spectrophotometer, Ultrospec Plus, Typ 4054, Pharmacia LKB-Biotechnologie, Freiburg, D

b) Materialien

- * Messung der Lipide
 - Cholesterin: Monotest-Cholesterin, CHOD-PAP, Boehringer Mannheim, D
 - Triglyceride: Peridochrom Triglyceride, GPO-PAP, Boehringer Mannheim, D
 - HDL-Chol.: HDL-Chol.-Fällungsreagenz, Boehringer Mannheim, D
- * Messung der Apolipoproteine
 - N-Diluent, OUMT 61, DADE Behring, Marburg, D
 - N-Reaktionspuffer, OUMS 61, DADE Behring, Marburg, D
 - N-Zusatzreagenz, OUMU 15, DADE Behring, Marburg, D
 - N-Apolipoprotein-Standard-Serum, OUPG 07, DADE Behring, Marburg, D
 - N-Antiserum gg. Human-ApoB (Kaninchen), OSAN 194 E30, DADE Behring
 - N-Antiserum gg. Human-ApoE (Ziege), OQDL 192 C21, DADE Behring
- * Messung der VLDL-Proteinkonzentration
 - Albumin 95% pulv (69.000g/mol), Carl-Roth-GmbH+Co, (8076), Karlsruhe, D
 - Bio Rad Protein Assay, Farbstoffkonzentrat, (500-0006), Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
 - Acryl-Cuvetten, Nr. 67.740, Sarstedt, D

c) Analytische Verfahren

Für die Bestimmung des Gesamtcholesterin- und Triglycerid-Spiegels in Plasma und VLDL wurden konventionelle enzymatische Farbstests (nach Siedel, 1983; Wahlefeld, 1974) verwendet (Boehringer, Mannheim GmbH). Durch eine Fällungsreagenz wurden Chylomikronen, VLDL und LDL aus den Proben gefällt und nach Abzentrifugation der HDL-Fraktion, der HDL-Cholesterin-Spiegel gemessen (nach Burstein, 1970). Der LDL-Wert wurde rechnerisch über die Friedewald-Formel ermittelt ($\text{LDL-Chol} = \text{Chol}_{\text{Ges}} - \text{TG}/5 - \text{HDL}$ für $\text{TG} < 350\text{-}400\text{mg/dl}$; Friedewald et al, 1972)

Im Plasma und VLDL der Proben 3, 15, 20, 23 wurden die ApoB- und ApoE-Konzentrationen mittels Immun-Nephelometrie gemessen. Die Konzentration des VLDL-ApoCIII wurde nur näherungsweise geschätzt. Dazu wurde der Gesamtproteingehalt des VLDL nach Lowry (Lowry et al, 1951) photometrisch bestimmt und davon die nephelometrisch gemessene ApoB-Konzentration subtrahiert. Aus den HPLC-Chromatogramm-Analysen wurde der prozentuale Anteil des ApoCIII an der Gesamtmenge der aufgetrennten Apoproteine ermittelt. Damit wurde die VLDL-ApoCIII-Konzentration als prozentualer Anteil am VLDL-nicht-ApoB-Protein errechnet. Bei der Differenzierung der ApoE-Isoformen ApoE3 und ApoE4 wurde ebenfalls die Konzentration der Isoformen als prozentualer Anteil – ebenfalls aus den Chromatogramm-Analysen abgeschätzt – des nephelometrisch gemessenen VLDL-Gesamt-ApoE ermittelt. Die Apolipoprotein-Poolgrößen wurden durch Multiplikation der gemessenen Konzentrationen mit dem Plasmavolumen errechnet (Dagher et al, 1965).

Unter der Voraussetzung, dass sich der Stoffwechsel zum Zeitpunkt der Messungen in einem Steady-State befunden hat, stellen die angegebenen Werte den Durchschnitt der vier Messungen dar.

2.3.5 Isolierung der Plasmaamino­säuren

a) Technische Ausstattung

- * Bead Bath Evaporator, N-EVAP, Organomation assoc. inc., West Berlin, MA, USA
- * Vakuumkonzentrator mit Kühlfalle und Vakuumpumpe, s. o.

b) Materialien

- * Säulen: Whale Scientific, Commerce City, USA
- * Kationen-Austauscherharze: AG50W-X8, Bio Rad, Richmond, CA, USA
- * Chemikalien
 - 1N Essigsäure: 5.7ml Eisessig auf 100ml aqua bid.
 - Essigsäure (Eisessig) 100% pro analysi, $C_2H_4O_2$ (60.05g/mol), Merck (1.0063)
 - 4M NH_4OH : 30.08ml NH_3 auf 100ml aqua bid.
 - Ammoniak 25% pro analysi, NH_3 (17.03g/mol), Merck (1.05432)
 - Salzsäure rauchend 37%, HCl (36.46g/mol), Merck (1.00317)

c) Analytische Verfahren

Die Plasmaamino­säuren wurden durch Kationen-Austauscherharze über Säulen isoliert (Adams et al, 1984; Schwartz et al, 1980). Dazu wurden 300µl Serum mit 400µl Essigsäure versetzt. Vor und nach Zugabe von 1ml Austauscherharz und 1ml 1N Essigsäure wurden die Säulen mehrere Male mit aqua bidest gespült, bevor die präparierten Proben eingefüllt wurden. Nach weiteren Spülvorgängen wurden zweimal 0.9ml 4M NH₄OH aufgefangen und über Nacht bei 120°C in einem Bead-Bath-Evaporator verdampft. Die Proben wurden mit 200µl HCl gelöst, die Salzsäure anschließend im Vakuumkonzentrator wieder verdampft.

2.3.6 Bestimmung der Tracer-Anreicherung und der Tracer/Tracee-Ratio

Das Leucin im Plasma bzw. in der ApoB-, ApoCIII- und ApoE-Fraktion wurde zu n-acetyl-n-propanol-Estern derivatisiert (Matthews et al, 1979; Calder et al, 1988).

In dem durch die Präparation entstandenen Aminosäuren-Gemisch wurde die Anreicherung des D₃-Leucins mit dem Gaschromatographie-Massenspektrometer (GCMS; Trio 1000; Fisons Instruments, Manchester, UK) bestimmt (Demant et al, 1994).

Da die Masse der mit stabilen Isotopen markierten Tracer-Aminosäuren nicht vernachlässigbar ist, wurden die Anreicherungsdaten in Tracer/Tracee-Ratios umgewandelt (Cobelli et al, 1992). Diese Tracer/Tracee-Ratios entsprechen der Spezifischen Aktivität bei Versuchen mit Radioisotopen.

2.4 Modelling

Zur Quantifizierung der kinetischen Parameter, z. B. der FCR (Fractional Catabolic Rate) und der Produktionsrate, wurde ein Multi-Kompartiment-Modell verwendet. Dieses Modell wurde auf der Grundlage bisher publizierter Multi-Kompartiment-Modelle zur Beschreibung des VLDL- und ApoB-Metabolismus entwickelt (Berman et al, 1978; Beltz et al, 1985; 1990; Demant et al, 1988; 1996; Fisher et al, 1991; Packard et al, 1995; Parhofer et al, 1991; 1992; 1996; 2000) und ist in Abb. 2.4 gezeigt.

Die Interpretation der Tracerdaten kann nur unter Berücksichtigung des Verhaltens des Tracers im hepatocellulären Precursor Pool (amino-acyl-tRNA) erfolgen. Dieser Pool ist jedoch bei in-vivo Untersuchungen nicht direkt zugänglich. Aus diesem Grund wurde die Traceranreicherung in der amino-acyl-tRNA der untersuchten Apoproteine aus den Plasma-Aminosäure-Daten abgeschätzt. In diesem Modell wird damit die Traceranreicherung im hepatocellulären Precursor Pool als parallel zur Anreicherung im Plasma angesehen.

Die Plasma-Aminosäuren sind im verwendeten Modell durch vier Kompartimente repräsentiert. Die über dieses Submodell errechneten Tracer/Tracee-Ratios der Plasma-Aminosäuren können durch eine Funktion mit 4 Exponenten beschrieben werden. Während des Modellingsprozesses der Apolipoproteine wurde diese Funktion als sogenannte Forcing-Funktion übernommen. Das bedeutet, dass während des Modellings der Apolipoprotein-Daten keine Veränderungen an den Parametern der Plasma-Aminosäuren mehr vorgenommen werden.

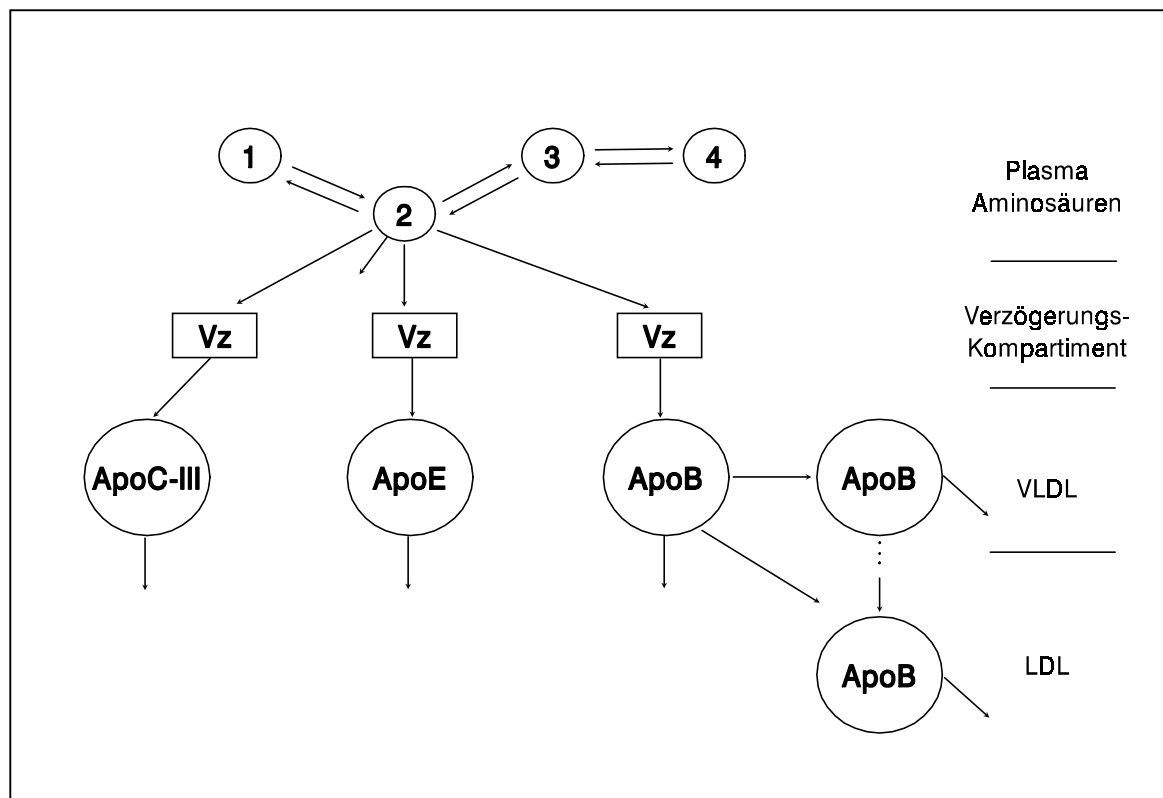
An die 4 Kompartimente der Plasma-Aminosäuren schließen sich Verzögerungskompartimente an, um den Zeitraum bis zum Erscheinen des Tracers in den Plasma-Apolipoproteinen zu beschreiben. Diese Kompartimente umfassen damit sowohl die intrahepatische Produktion als auch die Sekretion der neusynthetisierten Apoproteine in den Blutkreislauf.

Die Anreicherungsdaten für die Apoproteine ApoCIII und ApoE wurden jeweils durch ein 1-Pool-Modell beschrieben.

Ähnlich wie in früheren Untersuchungen (Beltz et al, 1985, Beltz et al 1990; Barrett et al, 1991; Fisher et al, 1991; Parhofer et al, 1993; Demant et al, 1994; Packard et al, 1995; Demant et al, 1996) wurde der VLDL-ApoB-Metabolismus durch ein Modell mit einem Kompartiment mit einer hohen Durchsatzrate und einem zweiten Kompartiment mit langsamem Durchsatz beschrieben. Diese Kompartimente stehen miteinander direkt in Verbindung. Aus beiden VLDL-Kompartimenten kann ApoB direkt an das Plasma abgegeben oder in den LDL-Stoffwechsel eingeschleust werden. Der LDL-ApoB-Metabolismus wurde ebenfalls mit einem Kompartiment beschrieben, das aus beiden VLDL-ApoB-Kompartimenten Input erhält.

Die Modellparameter wurden durch Minimierung der Abweichungsquadrate (least squares approach) an die beobachteten Tracer/Tracee-Ratios angepasst. Dazu wurden SAAM II-Computerprogramme (SAAM Institute, Seattle, WA, USA) verwendet. Aus diesen Daten wurde die FCR (Fractional Catabolic Rate) und die Produktionsrate (PR) der einzelnen Apolipoproteine berechnet. Die Produktionsrate ist das Produkt aus Umsatzrate der einzelnen Pools und der jeweiligen Apoprotein-Konzentration. Bei den Apolipoproteinen ApoCIII und ApoE entspricht die FCR direkt der Abbaurate des jeweiligen VLDL-Kompartiments. Die FCR des VLDL-ApoB ist hingegen die Summe der individuellen Umsetzungsraten der beiden VLDL-Pools. Diese VLDL-ApoB-Umsatzrate umfasst damit neben den Umwandlungsprozessen innerhalb des VLDL auch die Konversion von VLDL zu LDL, sowie die Entfernung der Apoproteine aus dem Plasma.

Abb. 2.4 Multi-Kompartiment-Modell



3. Ergebnisse

3.1 Apolipoprotein-Konzentrationen und ApoE-Phänotypisierung

Zunächst sollen die Ergebnisse der 6 normolipämischen Probanden dargestellt werden.

Die Konzentrationen des VLDL-Cholesterins, der VLDL-Triglyceride, sowie die Gesamtproteinkonzentration in der VLDL-Fraktion sind in Tabelle 3.1.1 aufgeführt.

In Tabelle 3.1.2 sind die Konzentrationen der VLDL-Apolipoproteine ApoB, ApoE3 und ApoCIII, sowie die ApoE-Phänotypen gezeigt. An der vorliegenden Studie nahmen zwei Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E4 (Nr.1; Nr.3) und vier Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E3 (Nr.2, 4, 5, 6) teil. Die Phänotypisierung erfolgte durch Isoelektrofokussierung und ließ sich im zweigipfligen Verlauf des ApoE-Peaks im HPLC-Lauf (s. u.) bestätigen.

Die angegebenen Konzentrationen stellen den Mittelwert aus vier Messwerten dar, die zum Zeitpunkt der Proben Nr. 3, 15, 20 und 23 ermittelt wurden. Für den gesamten Untersuchungszeitraum kann ein Steady State angenommen werden, da die Konzentrationen in den vier Messungen konstant blieben.

Das VLDL-Cholesterin lag bei den Probanden Nr. 1 bis 6 bei 10.67 ± 2.49 mg/dl, die VLDL-Triglyceride bei 56.17 ± 11.95 mg/dl. Die Konzentration des nephelometrisch bestimmten VLDL-ApoB betrug 4.66 ± 0.87 mg/dl.

Bei der verwendeten Meßmethode wird in der VLDL-Fraktion nicht zwischen ApoE3- bzw. ApoE4-Konzentration differenziert, sondern die Gesamt-VLDL-ApoE-Menge bestimmt. Bei den Probanden mit Phänotyp E3/E3 entspricht diese Messung der ApoE3-Konzentration. Bei den Probanden mit Phänotyp E3/E4 wurde die Konzentration an ApoE3 aus dem Chromatogramm abgeschätzt und errechnet sich als 52% (Prob. Nr. 1) bzw. 40% (Prob. Nr. 3) des nephelometrisch bestimmten Gesamt-VLDL-ApoE (siehe 2.3.4). Die so ermittelte Konzentration für VLDL-ApoE3 lag bei $0.62 \text{ mg} \pm 0.15 \text{ mg/dl}$ Plasma.

Nach Lowry (Lowry et al, 1951) wurde die VLDL-Gesamt-Protein-Konzentration bestimmt (5.72 ± 1.06 mg/dl). Die aus dem HPLC-Chromatogramm als prozentualer Anteil (63 – 73%) des VLDL-nicht-ApoB-Proteins geschätzte ApoCIII-Konzentration (siehe Methodik 2.3.4) lag bei 0.85 ± 0.17 mg/dl.

Tab. 3.1.1 VLDL-Konzentrationen Probanden Nr. 1 - 6

VLDL

Proband Nr.	ApoE- Phänotyp	VLDL-CHOL (mg/dl)	VLDL-TG (mg/dl)	VLDL-Protein (mg/dl)
1	E3/E4	13	61	8.15
2	E3/E3	8	37	5.23
3	E3/E4	5	34	3.26
4	E3/E3	12	75	5.52
5	E3/E3	6	32	3.30
6	E3/E3	20	98	8.87
MW		10.67	56.17	5.72
SD		2.49	11.95	1.06

Tab. 3.1.2 VLDL-Apolipoprotein-Konzentrationen Probanden Nr. 1 - 6

VLDL-ApoB-, ApoE- und ApoCIII-Konzentrationen

Proband Nr.	ApoE- Phänotyp	ApoB (mg/dl)	ApoE3 (mg/dl)	ApoCIII (mg/dl)
1	E3/E4	7.18	1.09	0.69
2	E3/E3	3.39	0.75	1.16
3	E3/E4	2.53	0.17	0.53
4	E3/E3	4.60	0.89	0.59
5	E3/E3	3.41	0.44	0.77
6	E3/E3	6.86	0.39	1.28
MW		4.66	0.62	0.85
SD		0.87	0.15	0.17

3.2 Isolierung der Apolipoproteine durch HPLC

Abbildung 3.2.1 zeigt exemplarisch den HPLC-Lauf einer VLDL-Probe bei Proband Nr.1 mit dem ApoE-Phänotyp E3/E4. Das Chromatogramm zeigt nach einem Initialpeak ($t = 0\text{min}$) die der gemessenen Absorption entsprechenden Peaks der einzelnen Fraktionen. Im zeitlichen Verlauf erscheinen dort nach den spezifischen Retentionszeiten in Abhängigkeit vom Acetonitril-Phosphatpuffer-Gradienten nacheinander die Peaks der Apolipoproteine ApoCI ($t = 10.5 - 12.5\text{min}$), ApoCIII ($t = 14.0 - 17.0\text{min}$), ApoCII ($t = 19.5 - 22.5\text{min}$), ApoE4 ($t = 30.5 - 31.5\text{min}$) und ApoE3 ($t = 31.0 - 34.0\text{min}$). Die Peaks waren anhand von Referenzproteinen (reine Apoproteine) identifiziert worden. Die maximal gemessene Absorption, sowie die Fläche der einzelnen Peaks entspricht größenordnungsmäßig der im Probengemisch vorhandenen Menge des jeweiligen Apoproteins. Dabei konnte der größte Peak nach einer Retentionszeit von 14.2min ApoCIII zugeordnet werden. Kleinere Peaks mit niedrigen Absorptionswerten z. B. nach 7min bzw. 10min wurden nicht genauer charakterisiert. Sie entsprechen aber am ehesten anderen Plasmaproteinen bzw. degradierten Apolipoproteinen.

Bei den Probanden Nr.1, 2, 4, 5, und 6 konnten sämtliche Proteinfractionen gut voneinander getrennt werden (Abb. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6). Bei Proband Nr.3 (Abb. 3.2.3) zeigten sich insgesamt so niedrige Absorptionswerte, dass eine exakte Abtrennung der beiden ApoE-Isoformen nicht möglich war.

Abb. 3.2.1 HPLC-Lauf Proband Nr. 1

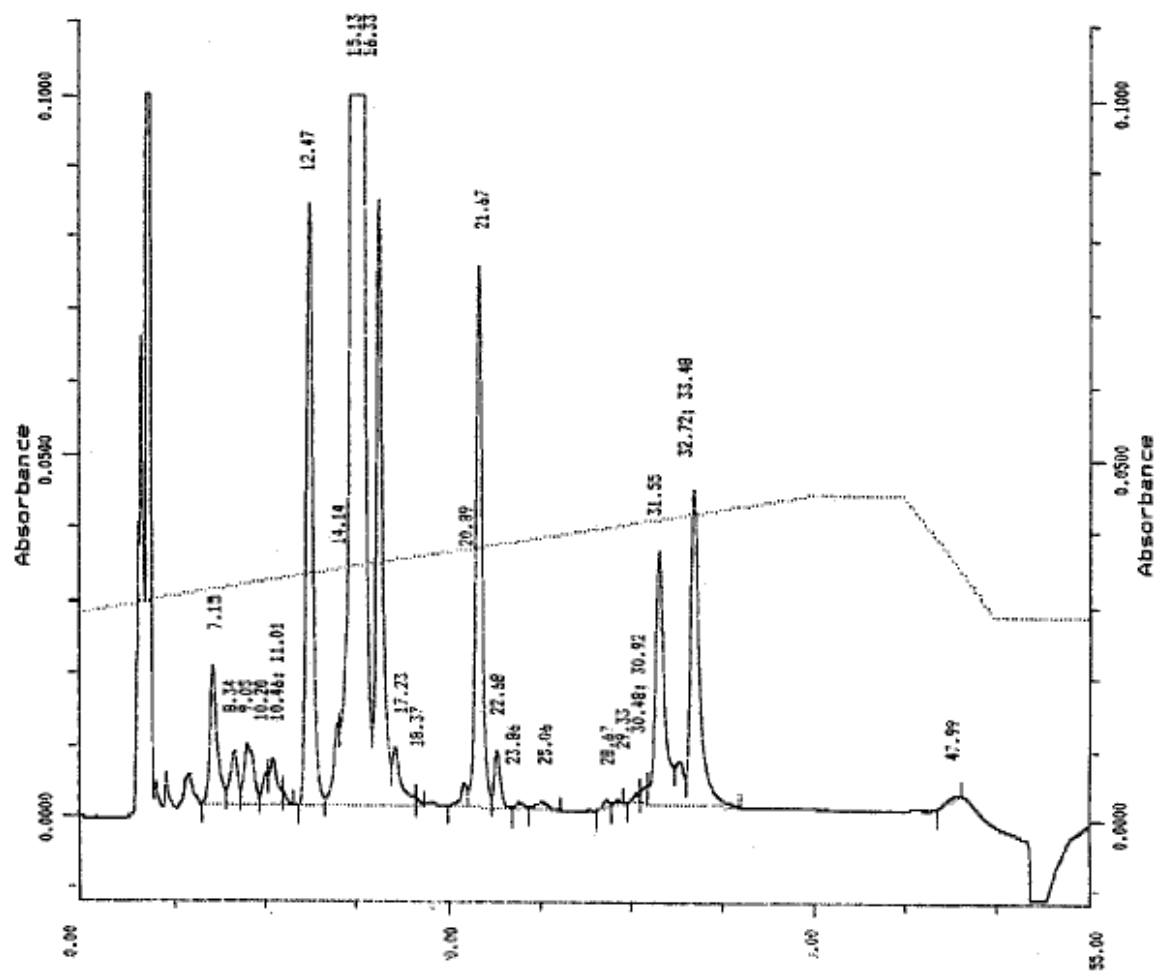


Abb. 3.2.2 HPLC-Lauf Proband Nr. 2

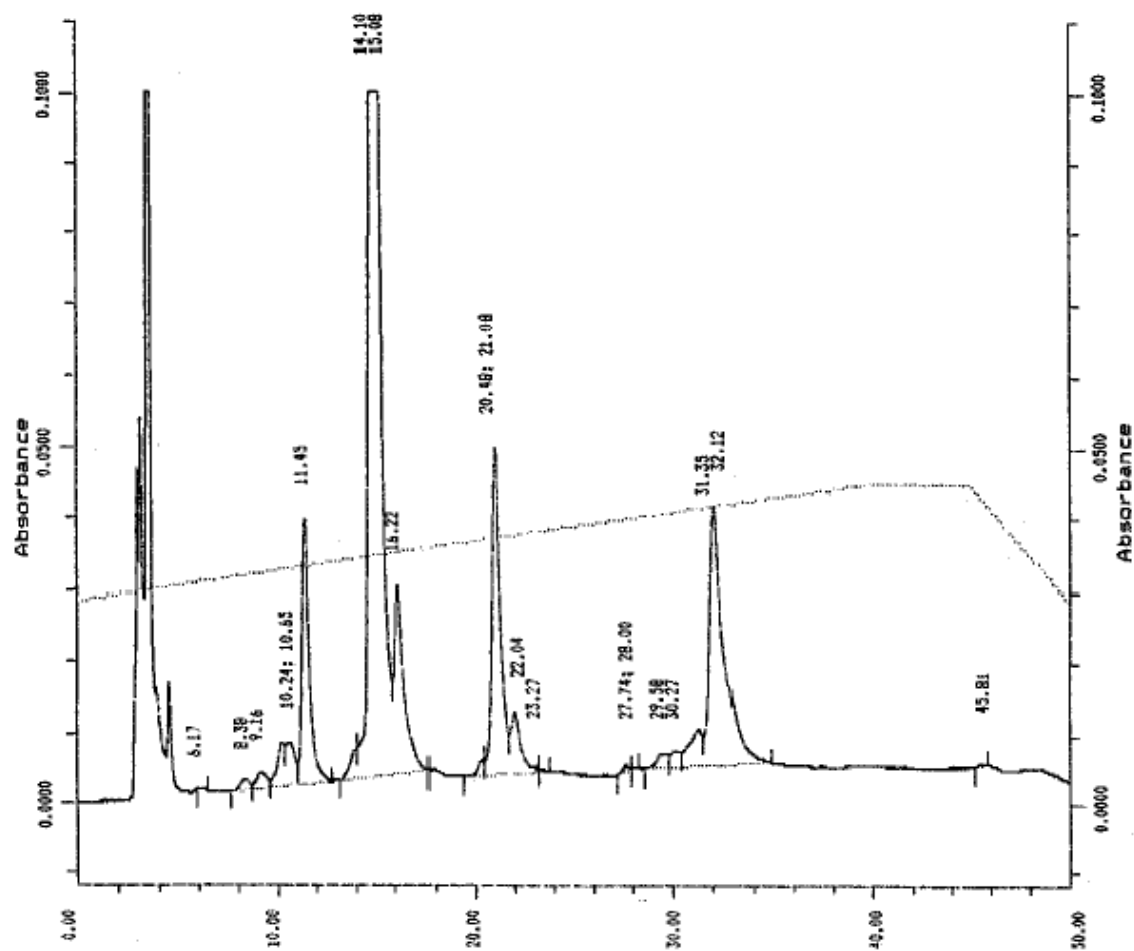


Abb. 3.2.3 HPLC-Lauf Proband Nr. 3

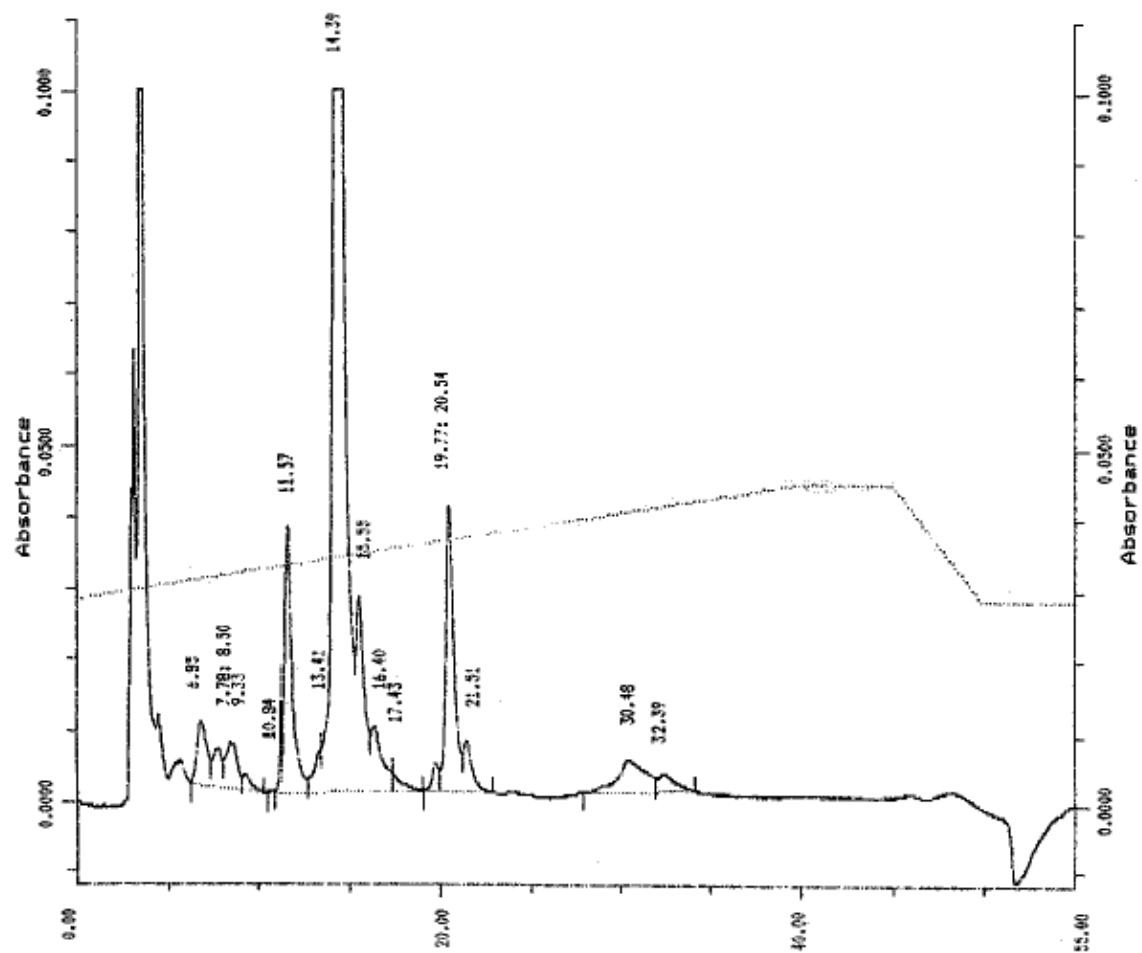


Abb. 3.2.4 HPLC-Lauf Proband Nr. 4

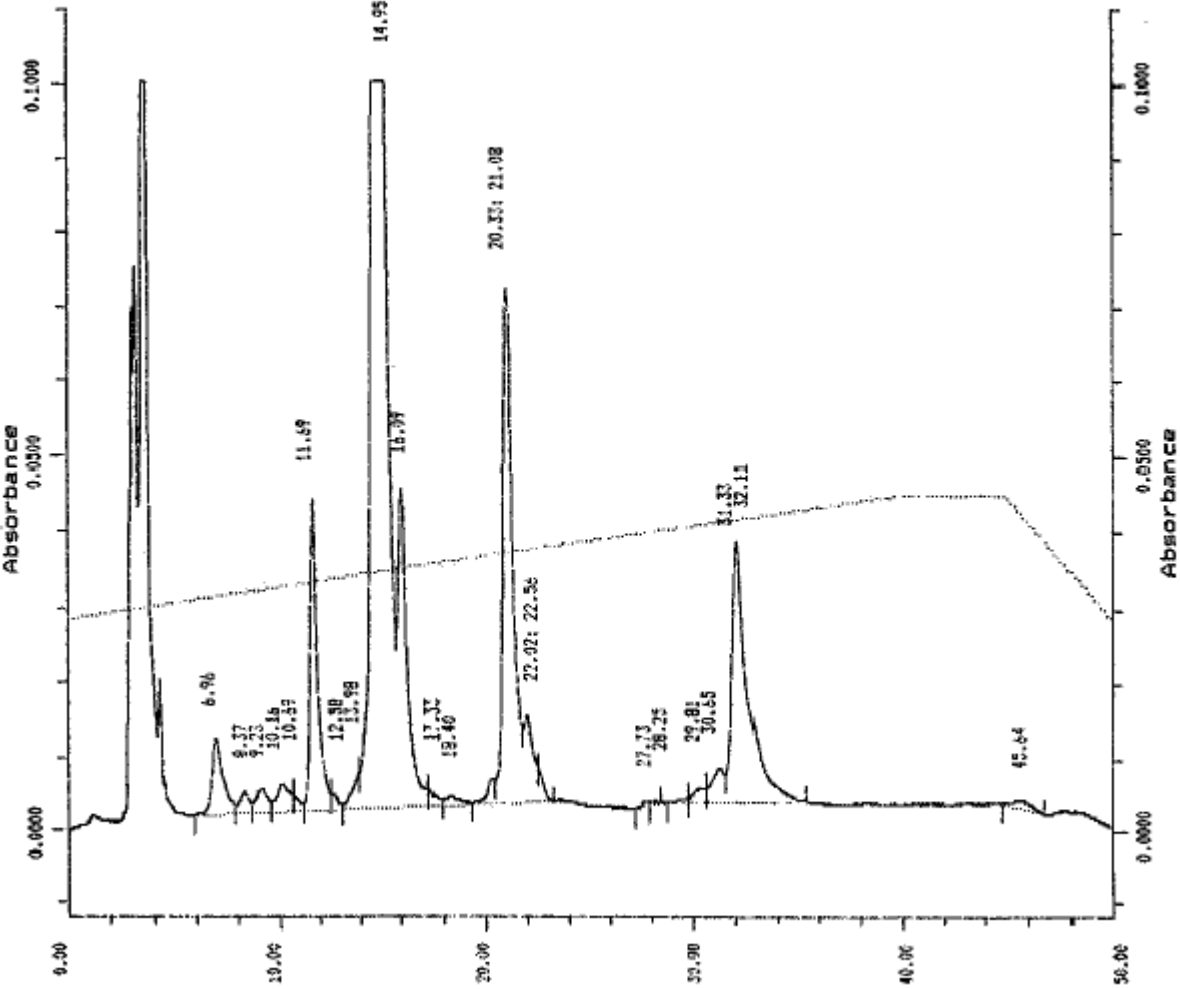


Abb. 3.2.5 HPLC-Lauf Proband Nr. 5

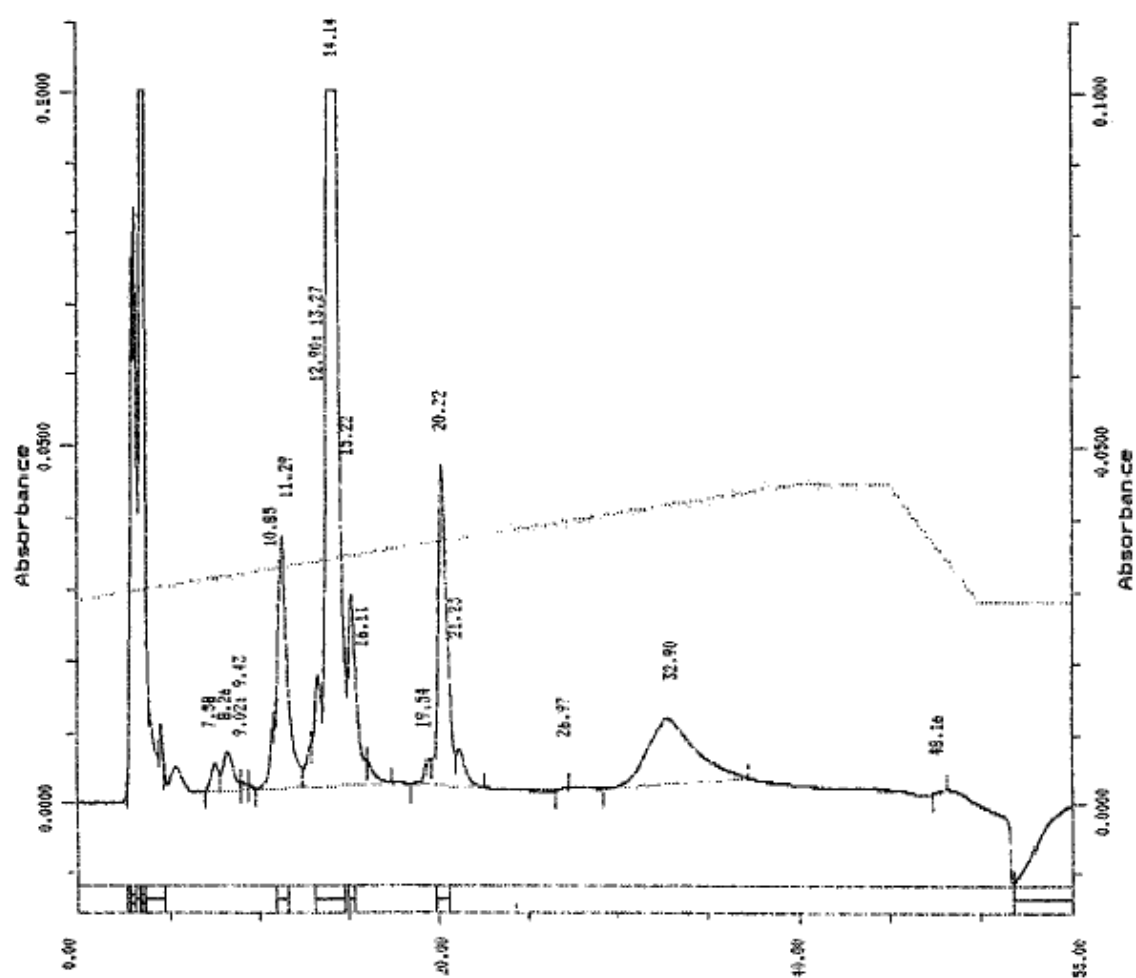
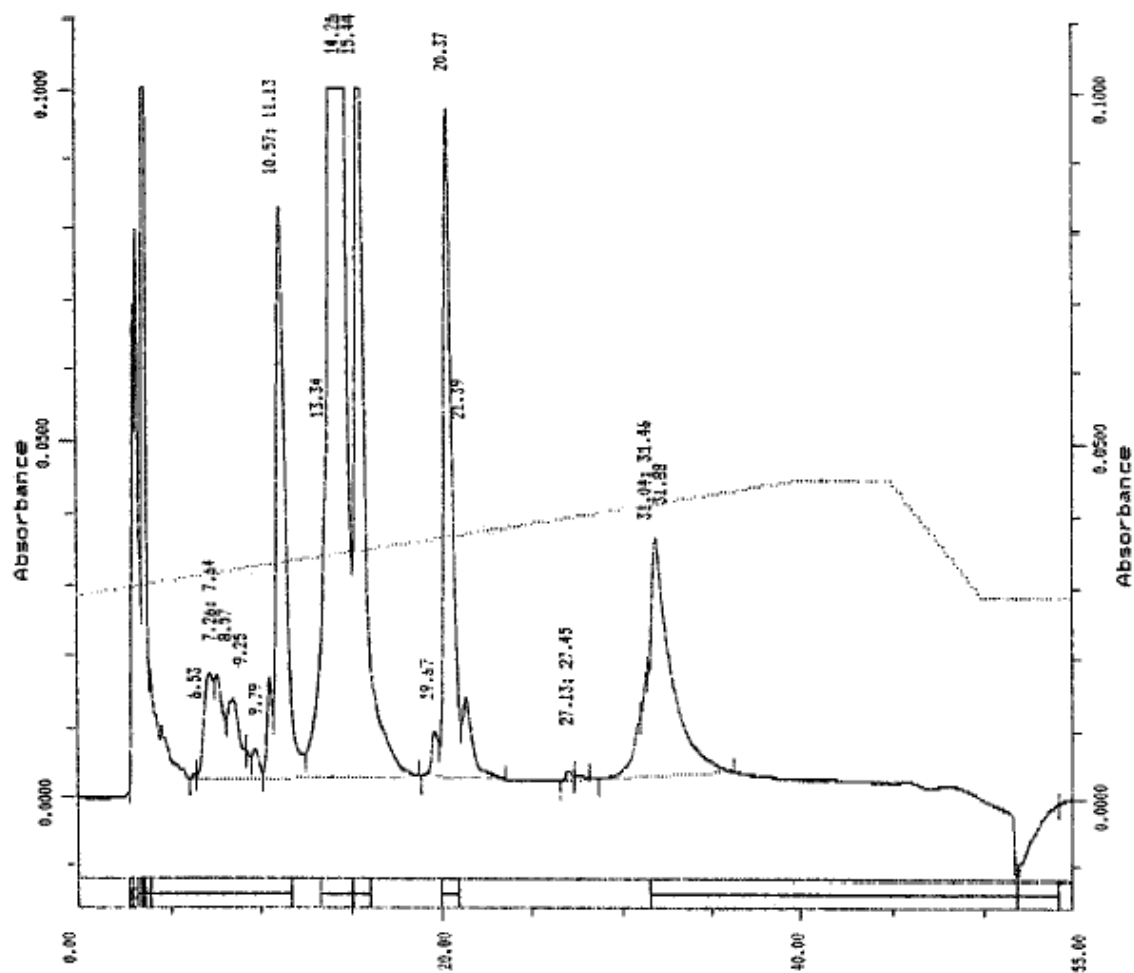


Abb. 3.2.6 HPLC-Lauf Proband Nr. 6

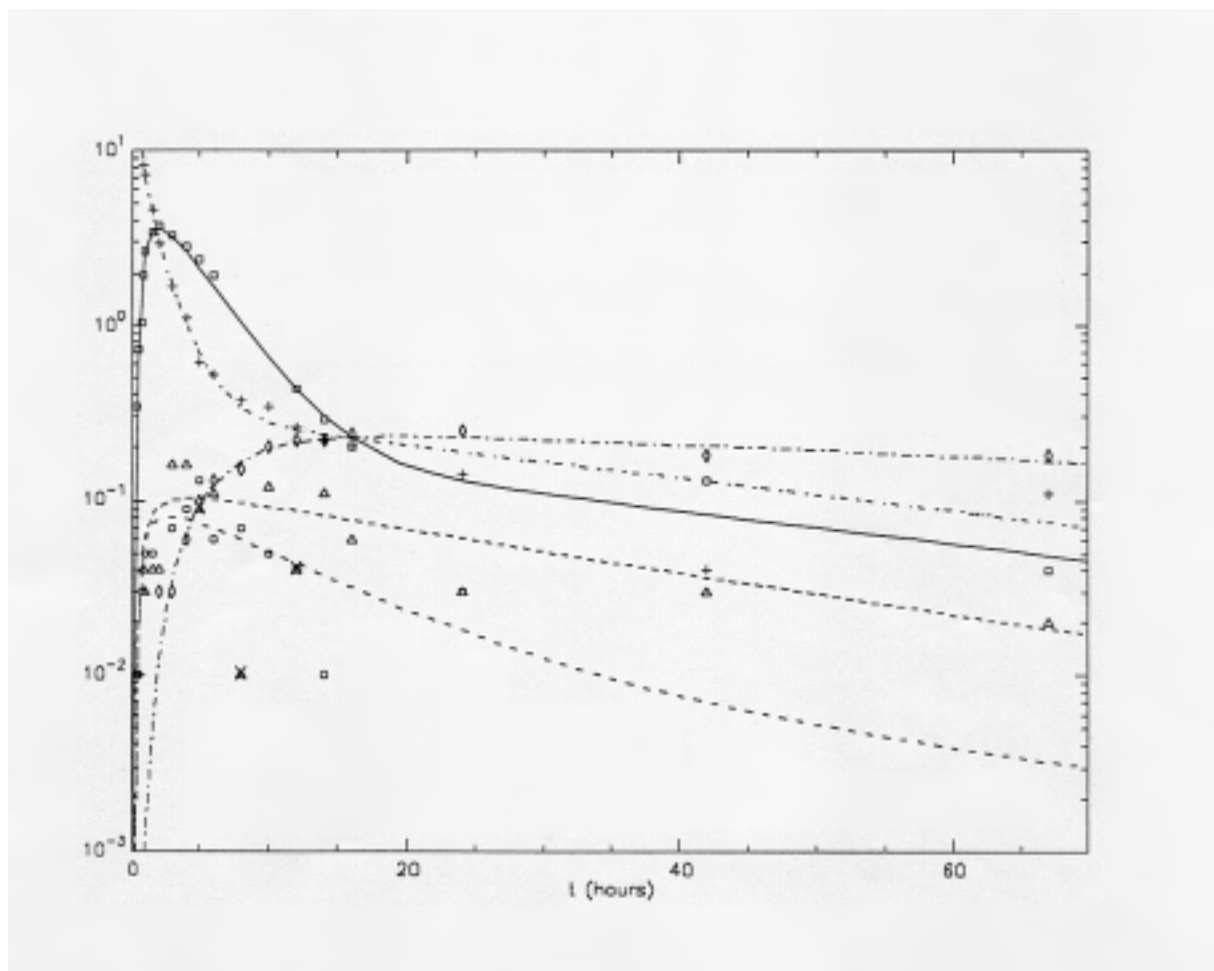


3.3 Tracer/Tracee-Ratios: VLDL-ApoB, VLDL-ApoCIII, VLDL-ApoE3, LDL-ApoB

Die Abbildungen 3.3.1 bis 3.3.6 zeigen den zeitlichen Verlauf der Tracer/Tracee-Ratios der Plasma-Aminosäuren, der VLDL-Apoproteine ApoB, ApoCIII und ApoE3, sowie des LDL-ApoB für jeden der untersuchten Probanden.

Im folgenden soll am Beispiel des Proband Nr.4 (Abb. 3.3.4) die Darstellung der Tracer/Tracee-Ratios ausführlich erläutert werden. Im Anschluß werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Probanden Nr.1, 2, 3, 5 und 6 daran orientierend kommentiert.

Abb. 3.3.4 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 4



	VLDL-ApoB	—————	s1
C	VLDL-ApoE3	- - - - -	s2
8	VLDL-ApoCIII	s4
I	LDL-ApoB	- . - . -	s5
Z	Plasma-AS	- - - - -	s6

Auf einer exponentiellen Skala im Wertebereich von 10^{-3} bis 10^2 sind die Anreicherungsdaten der Tracer/Tracee-Ratios in Prozent gegen die Zeit (0 bis 70 h nach Injektion des Tracers) aufgetragen. Dabei entsprechen die Symbole den tatsächlich beobachteten Daten, die Linien den durch das Multi-Kompartiment-Modell errechneten Werten.

Die Tracer/Tracee-Ratios der Plasma-Aminosäuren wurden auf der Basis eines eigenen Submodells mit 4 Kompartimenten (entsprechend der Summe von 4 Exponenten, d. h. $y(t) = A\exp^{at} + B\exp^{bt} + C\exp^{ct} + D\exp^{dt}$) beschrieben. Unmittelbar nach der Bolus-Injektion der markierten Tracer-Aminosäure zeigt sich eine hohe Anreicherung im Plasma, danach ein zunächst sehr rascher, dann langsamer Abfall der gemessenen Werte. Diese verschiedenen Phasen können durch 4 Exponenten nahezu perfekt beschrieben werden (Abb.3.3.4). Um zu verhindern, dass während des Iterationsprozesses (Modelling) der Apolipoprotein-Daten auch die Parameter der durch das Submodell bereits definierten Plasma-Aminosäuren wieder verändert werden, wurden die im Submodell festgelegten Parameter als sogenannte Forcing-Funktion für den Modellingprozeß der Apolipoprotein-Daten übernommen. Dies bedeutet, dass während des Modellings der Apolipoprotein-Daten keine Veränderungen an den die Plasma-Aminosäuren-Daten beschreibenden Parametern vorgenommen werden. Diese Parameter werden also während des Modellings der Apolipoprotein-Daten als a priori festgelegt behandelt.

In Abb. 3.3.4 ist gezeigt, dass für VLDL-ApoB und LDL-ApoB die beobachteten und vom Modell vorhergesagten Daten gut übereinstimmen.

Während die Anreicherung in der VLDL-ApoB-Fraktion sehr schnell ein hohes Niveau erreicht und dann ohne ein echtes Plateau zu bilden wieder abfällt, zeigt sich für das LDL-ApoB ein relativ langsamer Anstieg der Kurve. Wie aus früheren Studien bekannt, müsste man die LDL-ApoB-Fraktion über einen wesentlich längeren Zeitraum (mind. 2 Wochen) beobachten, um den langsamen Abfall der Anreicherungsdaten in toto erfassen zu können.

Unter der Annahme, dass die gemessenen Werte für die Plasma-Aminosäuren jenem Pool entsprechen, der der hepatischen Proteinproduktion zugrunde liegt, bedeutet dieser schnelle Anstieg der Anreicherung der Tracer-Aminosäure in der VLDL-ApoB-Fraktion, dass hier ein relativ großer Anteil des VLDL-ApoB-Pools mit einer hohen Geschwindigkeit umgesetzt wird. Das hier bereits nach kurzer Zeit nachweisbare neu synthetisierte VLDL-ApoB entstammt einem so im Modell (Abb. 2.4) postulierten VLDL-Kompartiment mit einer hohen Umsatzrate. Weiterhin ist die VLDL-ApoB-Tracer/Tracee-Kurve dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem schnellen Anstieg zu einem relativ breiten Gipfel, sowie zu einem langsameren Abfall kommt. Diese Teile der Kurve sind alleine mit dem o. g. sich schnell umsetzenden ApoB-Kompartiment nicht zu erklären. Deshalb wurde im Rahmen des Modellings ein zweites, sich

wesentlich langsamer umsetzendes Kompartiment postuliert. Reduziert man das VLDL-Modell auf lediglich ein Kompartiment, kann entweder der rasche Anstieg der Tracer/Tracee-Ratio oder der langsame Abfall nicht adäquat beschrieben werden. Das zweite VLDL-Kompartiment (Abb. 2.4) wird dabei aus dem ersten VLDL-Kompartiment gespeist. Durch dieses Modell mit zwei Kompartimenten mit unterschiedlichen Umsatzraten und Poolgrößen lässt sich der VLDL-ApoB-Stoffwechsel gut beschreiben.

Beide VLDL-ApoB-Kompartimente sind im Modell mit einem einzelnen Kompartiment, welches LDL-ApoB repräsentiert, verbunden.

Würde das gesamte LDL-ApoB aus einer schrittweisen Delipidierung der VLDL-Partikel stammen, müsste der Tracer in der LDL-Fraktion mit einer deutlichen Verzögerung auftreten. Das schnelle Erscheinen des Tracers in der LDL-Fraktion spricht dafür, dass ApoB auch über andere Stoffwechselwege die LDL-Fraktion erreichen kann (z.B. Shunt-Weg, über welchen LDL-ApoB direkt aus dem schnell verstoffwechselten VLDL-ApoB entsteht). Die Anreicherung des Tracers im LDL-ApoB fällt nach dem langsamen Anstieg auch über einen relativ langen Zeitraum langsam wieder ab. Die Anreicherungs-Daten des LDL-ApoB sind im Modell durch ein Kompartiment, das einen im Vergleich zum VLDL-ApoB wesentlich niedrigeren Umsatz besitzt, erfasst. Diese vereinfachende Darstellung mit nur einem Kompartiment stellt für den LDL-ApoB-Stoffwechsel ein Minimal-Modell dar und lässt damit u. a. offen, ob das LDL-ApoB zumindest zu einem kleinen Teil aus VLDL-unabhängigen Pools entsteht.

Die Anreicherungsdaten für ApoE3 steigen ebenfalls sehr schnell an, erreichen jedoch nicht das hohe Niveau wie für VLDL-ApoB. Bei VLDL-ApoCIII zeigt sich auch ein rascher Anstieg der gemessenen Werte, der aber nicht mit dem des ApoE3 zur Deckung gebracht werden kann. Es ist deutlich erkennbar, dass die Anreicherungen in den Apoproteinen ApoCIII und ApoE3 zwar ähnlich schnell wie in ApoB ansteigen, aber ein wesentlich niedrigeres Anreicherungsmaximum erreichen. Nach Erreichen des spezifischen Maximums fällt die Anreicherung deutlich langsamer ab als die des VLDL-ApoB. Es zeigt sich auch, dass weder die Kurven der Apoproteine ApoCIII und ApoE3 untereinander, noch mit denen des ApoB identisch sind. Während die Beschreibung der VLDL-ApoB-Daten ein Zwei-Pool-Modell erfordert, werden die ApoCIII- und ApoE-Daten durch ein einziges Kompartiment beschrieben. Limitierend ist hierbei die geringe Qualität der Anreicherungsdaten. Die Tracer/Tracee-Ratio für ApoCIII und ApoE streuen relativ stark, so dass unklar ist, ob stärkere Schwankungen der Tracer/Tracee-Ratio tatsächlich Stoffwechselereignisse widerspiegeln, oder es sich lediglich um Messungenauigkeiten handelt. Zwar wäre es theoretisch möglich, auch die ApoCIII- und ApoE-Daten durch zwei Kompartimente zu

beschreiben, allerdings wären dann die assoziierten Parameter mit großen Fehlern behaftet. Das in Abb. 3.3.4 gezeigte Beispiel zeigt, dass die Qualität der Anreicherungsdaten für ApoCIII und ApoE3 schlechter ist als für ApoB, und diese Daten damit auch die Entwicklung eines komplexeren Modells für die Apoproteine ApoCIII und ApoE nicht zulassen.

Für den **Probanden Nr.1** mit dem ApoE-Phänotyp E3/E4 konnten neben der Tracer/Tracee-Ratio des VLDL-ApoB und des VLDL-ApoCIII die Anreicherungsdaten der einzelnen ApoE-Isoformen ermittelt werden (Abb. 3.3.1). Die Tracer/Tracee-Ratios des VLDL-ApoE3 und VLDL-ApoE4 sind gesondert dargestellt (Abb. 3.3.1a). Dabei erreicht die Anreicherung bei beiden Isoformen ein ähnliches Niveau. Die Anreicherung des Tracers in der VLDL-ApoE4-Fraktion fällt nach einem etwas verzögertem Anstieg im Vergleich zur VLDL-ApoE3-Fraktion rascher wieder ab. Es zeigt sich hier neben den oben beschriebenen Ergebnissen, dass sich auch die einzelnen Isoformen des ApoE hinsichtlich ihrer Anreicherungsdaten unterscheiden.

Abb. 3.3.1a Tracer/Tracee-Ratio ApoE-Isoformen Proband Nr. 1

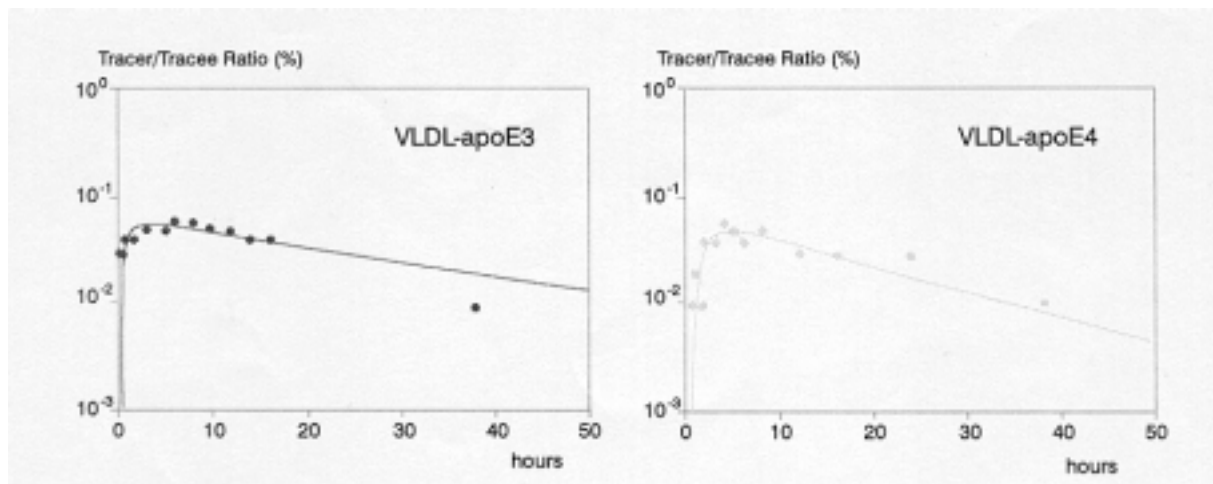
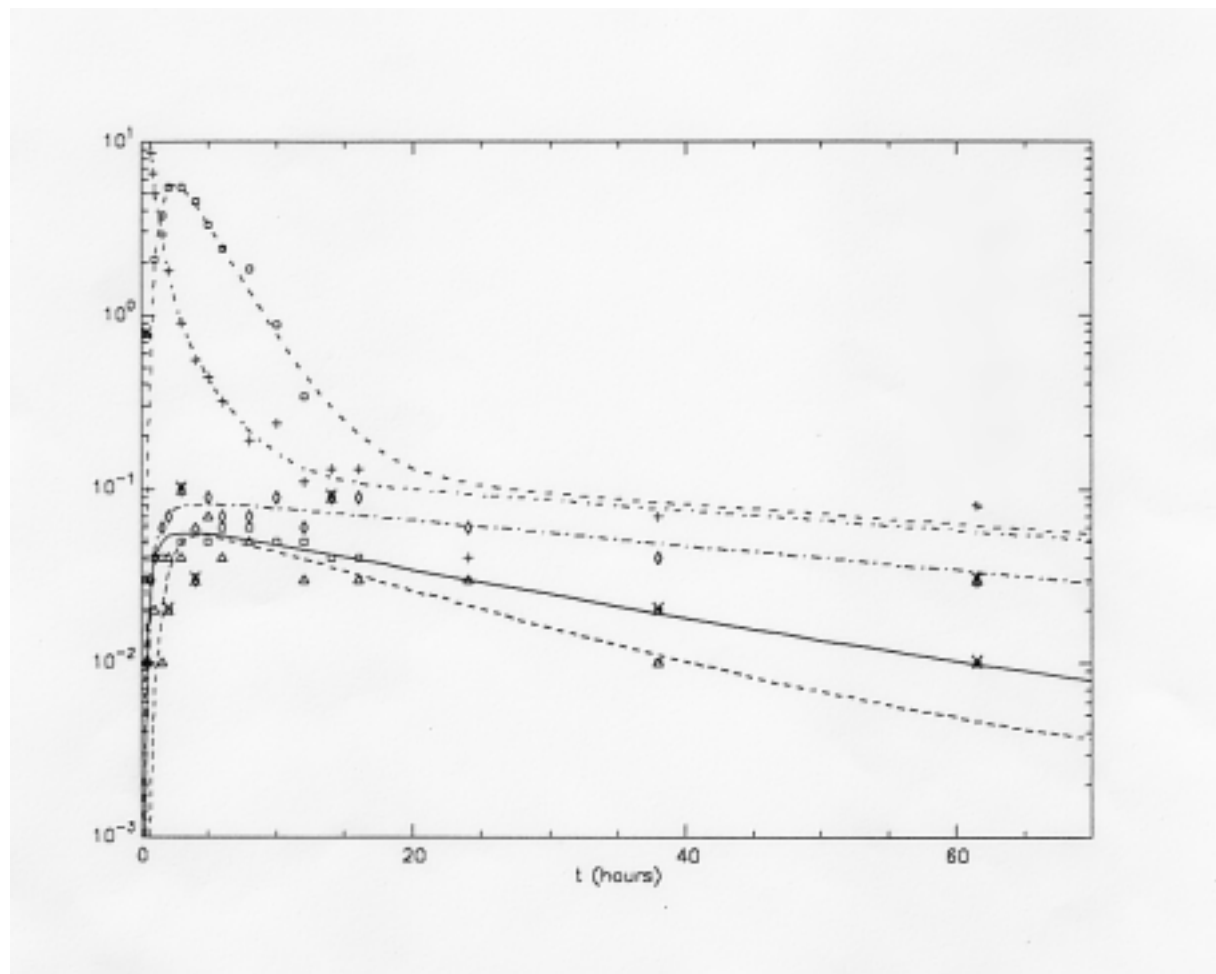


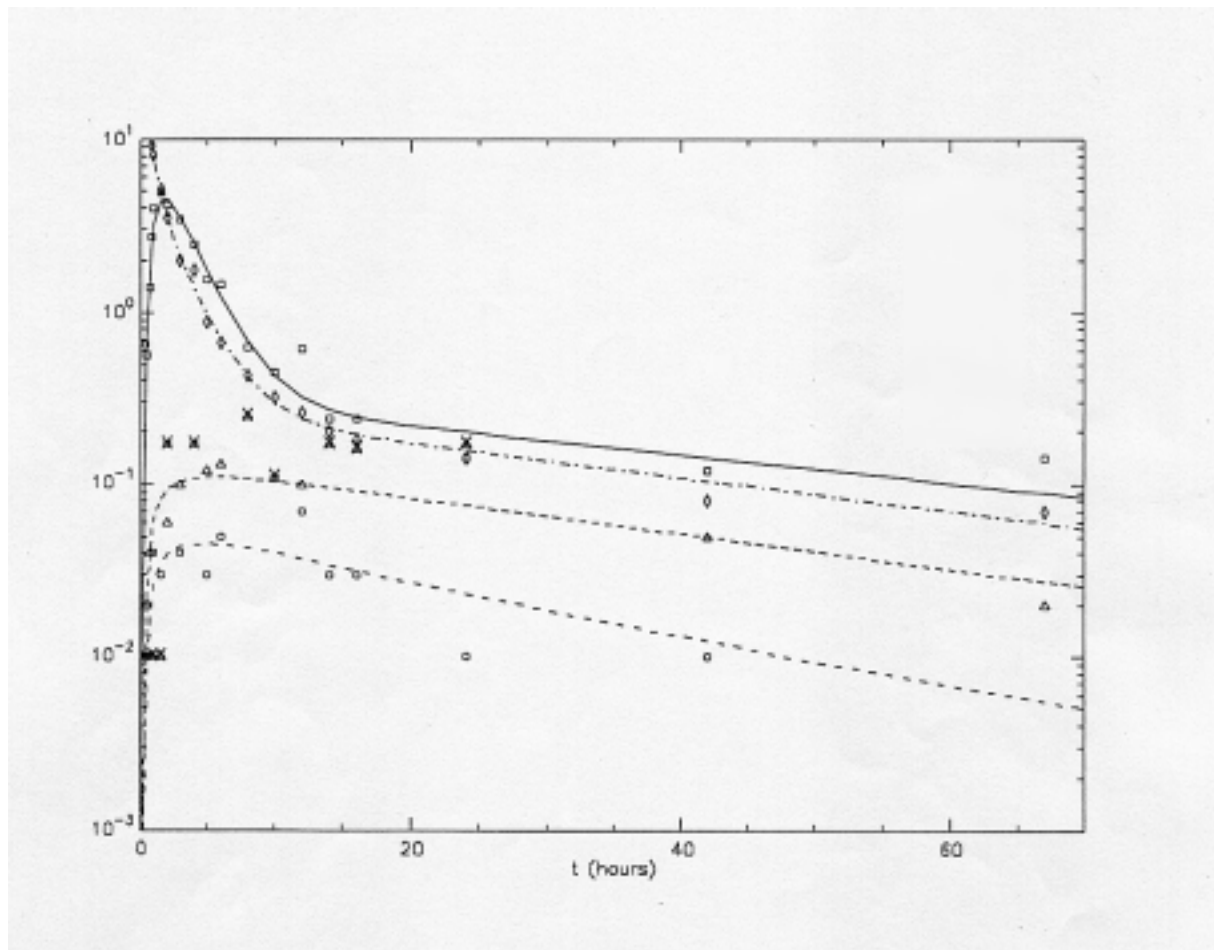
Abb. 3.3.1 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 1



C	VLDL-ApoB	-----	s2
	VLDL-ApoE3	-----	s1
8	VLDL-ApoE4	-----	s4
I	VLDL-ApoCIII	- - - - -	s5
Z	Plasma-AS	- - - - -	s6

Bei **Proband Nr.2** konnten Daten für VLDL-ApoB, VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE3 erhoben werden. Die in Abbildung 3.3.2 wiedergegebenen Anreicherungskurven bestätigen die für Proband Nr.4 beschriebenen Ergebnisse.

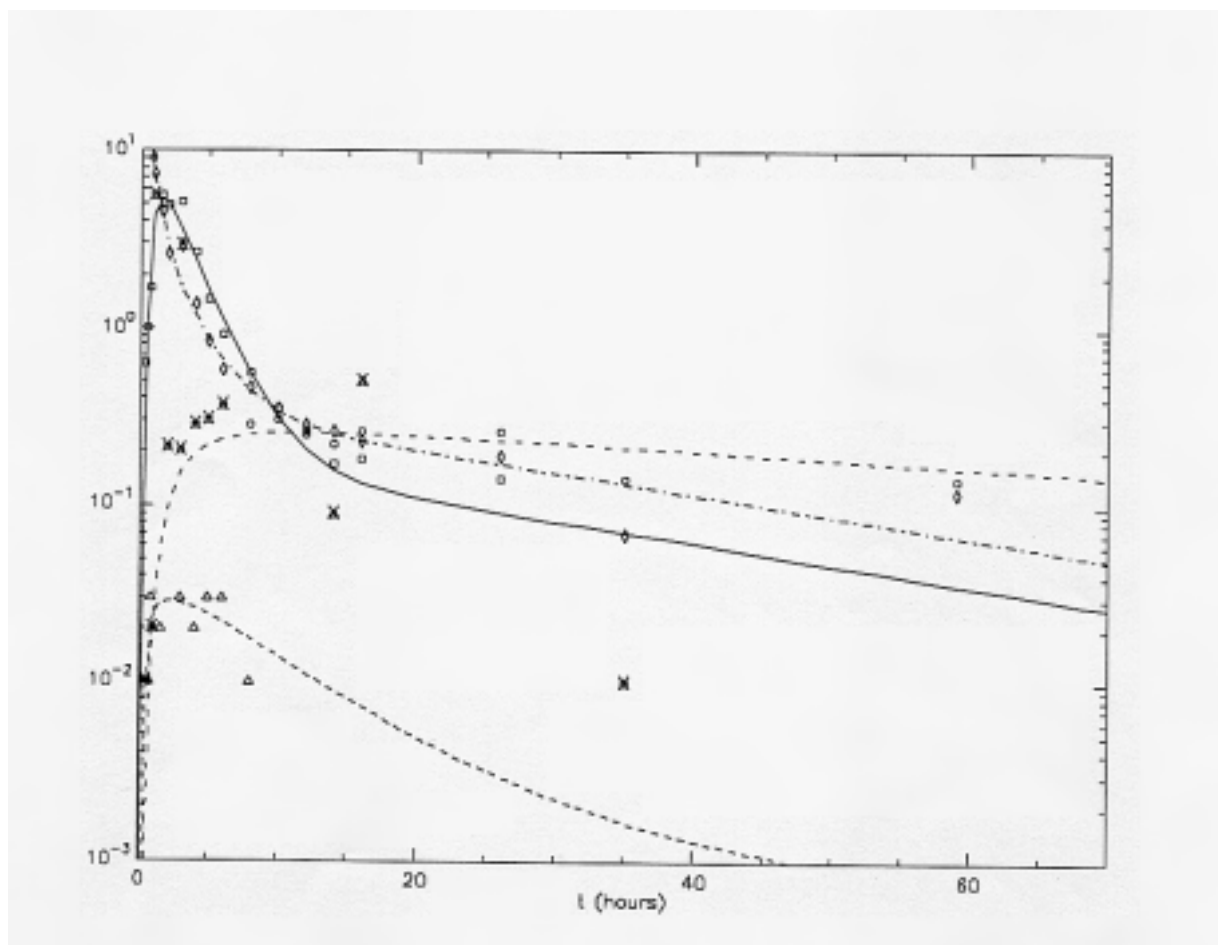
Abb. 3.3.2 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 2



	VLDL-ApoB	—————	s1
C	VLDL-ApoE3	- - - - -	s4
8	VLDL-ApoCIII	s5
I	Plasma-AS	- . - . - .	s6

Die Anreicherungsdaten des VLDL-ApoB und LDL-ApoB konnten bei **Proband Nr.3** (Abb. 3.3.3) durch das Multi-Kompartiment-Modell gut erfasst werden. Die Anreicherungsdaten für ApoCIII und ApoE waren jedoch in der VLDL-Fraktion so niedrig, dass hier eine Bestimmung der Tracer/Tracee-Ratio für ApoCIII nur eingeschränkt und für ApoE nicht möglich war. Die Beobachtungen, die bei Proband Nr.1 für die beiden ApoE-Isoformen gemacht wurden, konnten so bei diesem Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E4 weder bestätigt noch widerlegt werden.

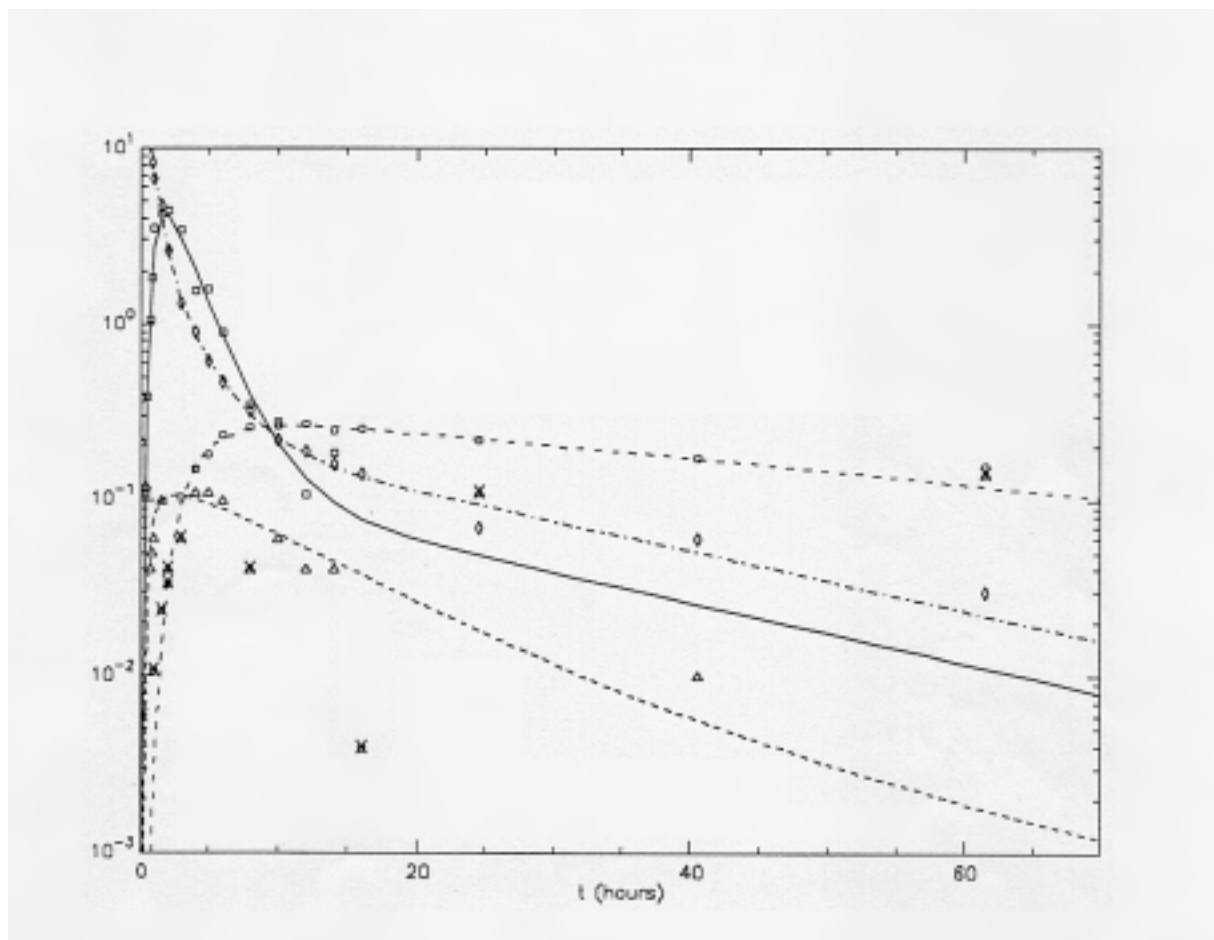
Abb. 3.3.3 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 3



	VLDL-ApoB	—————	s1
B	VLDL-ApoCIII	- - - - -	s4
C	LDL-ApoB	s3
I	Plasma-AS	- . - . -	s6

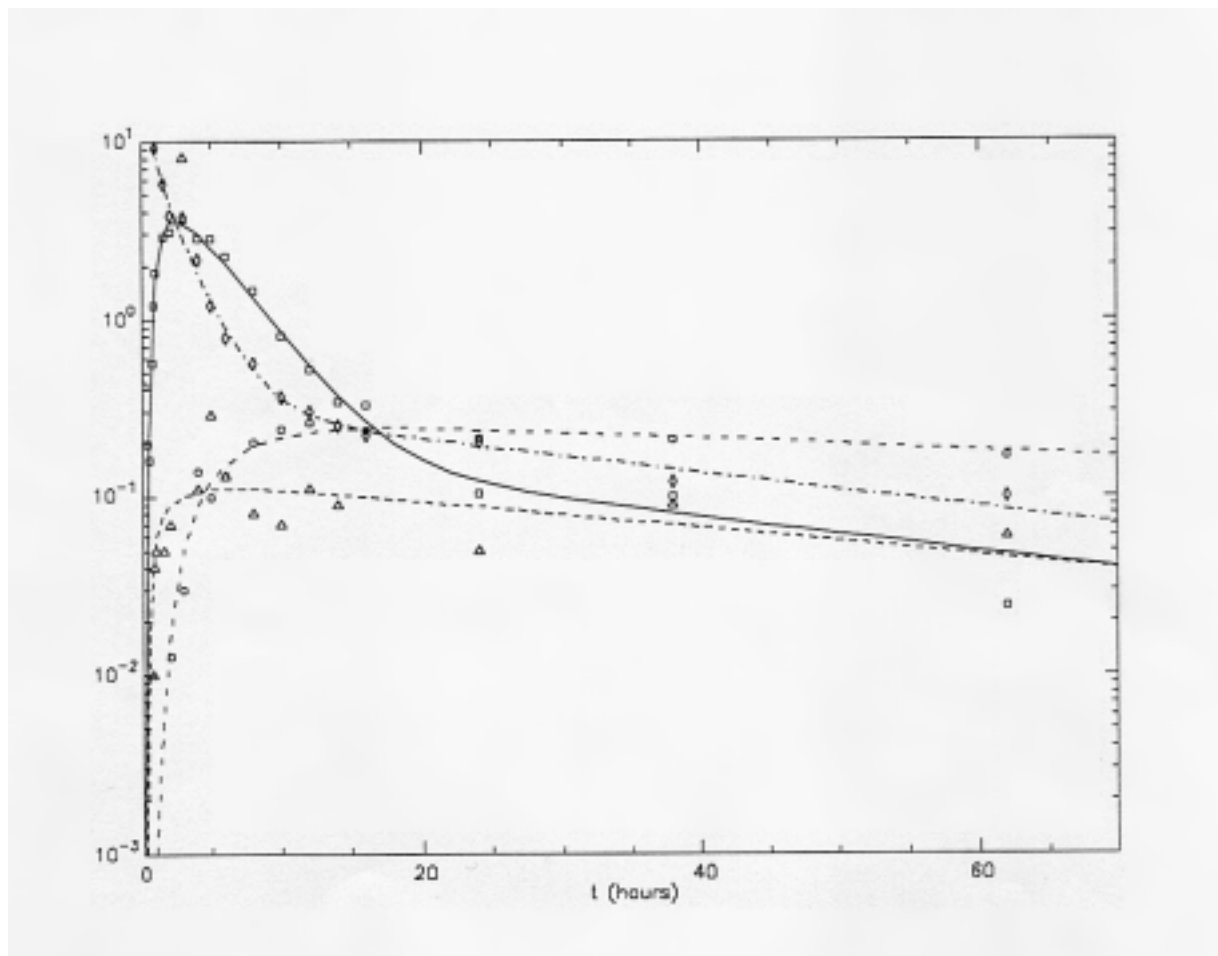
Durch die zu niedrigen Anreicherungen des markierten Leucins in der VLDL-ApoE-Fraktion konnten bei den **Probanden Nr.5 und Nr.6** ebenfalls nur die Daten für VLDL-ApoB und VLDL-ApoCIII bearbeitet werden. Obwohl auch bei diesen Probanden die Qualität der Daten für ein komplexeres Modelling für ApoCIII nicht ausreichend waren, ließen sich aus den gut erfassbaren Daten für VLDL- und LDL-ApoB die unterschiedlichen Verlaufskurven der einzelnen Apoprotein-Fractionen sichern (Abb. 3.3.5 und 3.3.6).

Abb. 3.3.5 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 5



	VLDL-ApoB	—————	s1
B	VLDL-ApoCIII	- - - - -	s4
C	LDL-ApoB	s3
Y	Plasma-AS	- . - . -	s6

Abb. 3.3.6 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 6



	VLDL-ApoB	—————	s1
8	VLDL-ApoCIII	-----	s4
C	LDL-ApoB	- . - . - . -	s3
I	Plasma-AS	- - - - -	s6

3.4 Kinetische Parameter: Fractional Catabolic Rate (FCR) und Produktionsrate

Der Modelling-Prozeß erlaubt auch eine Quantifizierung der o. g. Beobachtungen. Diese sind in Tab. 3.4.1 als Fractional Catabolic Rate (FCR [pools/d]) und als Produktionsraten (PR [mg/kg/Tag]) aufgeführt. Die den Daten zugrunde liegenden Anreicherungsdaten, sowie die Tracer/Tracee-Ratios der einzelnen Apolipoproteine sind in Abb. 3.4 bzw. Abb. 3.4.1 (VLDL-ApoB, LDL-ApoB), Abb. 3.4.2 (VLDL-ApoE3) und Abb. 3.4.3 (VLDL-ApoCIII) dargestellt (Probanden Nr. 1 – 6). In Tab. 3.4.1 sind zudem die Konzentrationen der untersuchten Apolipoproteine angegeben.

Abb. 3.4 Tracer/Tracee-Ratio Probanden Nr. 1 – 6

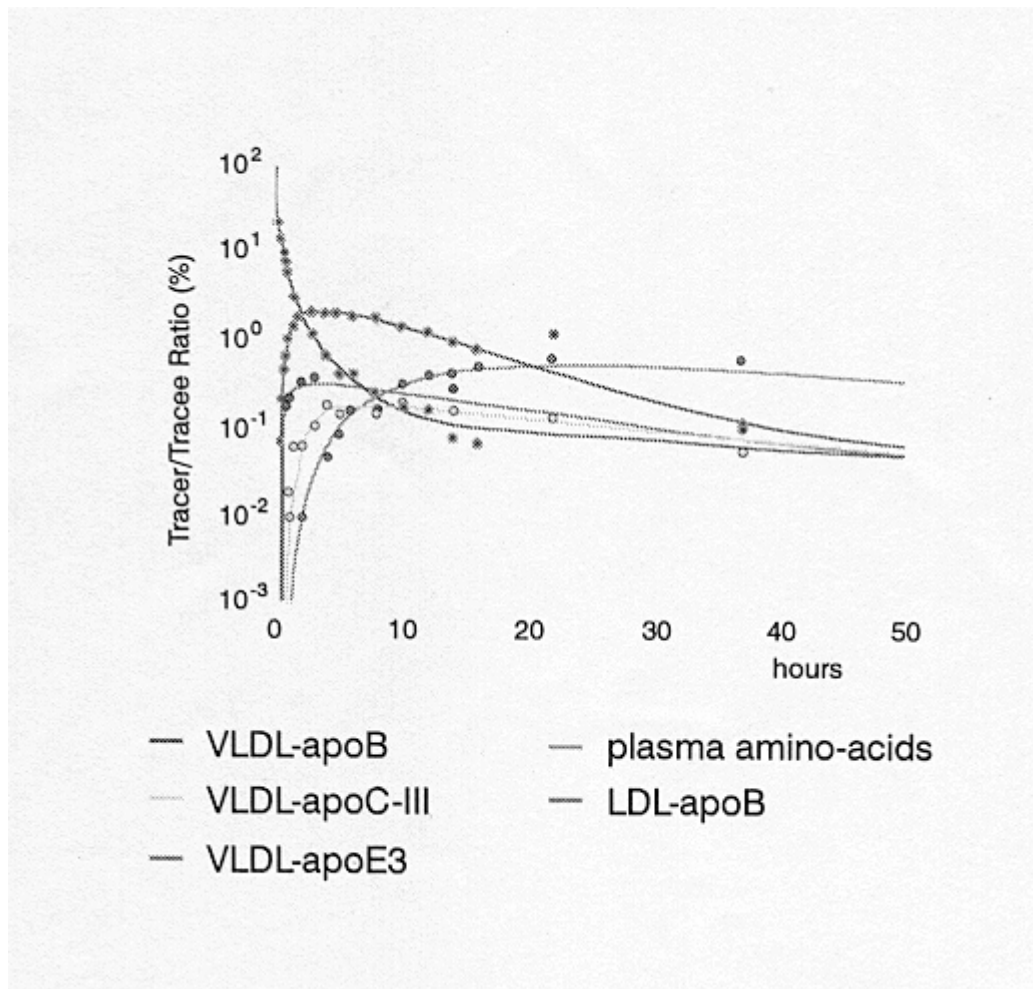


Abb. 3.4.1 VLDL-ApoB - LDL-ApoB

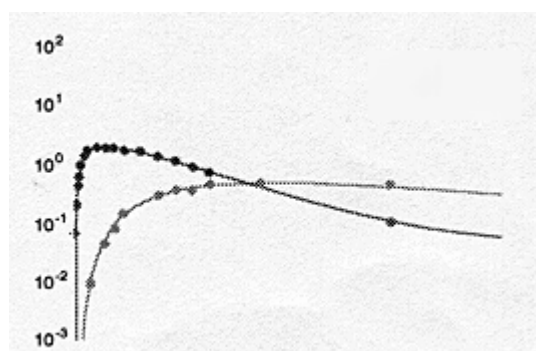
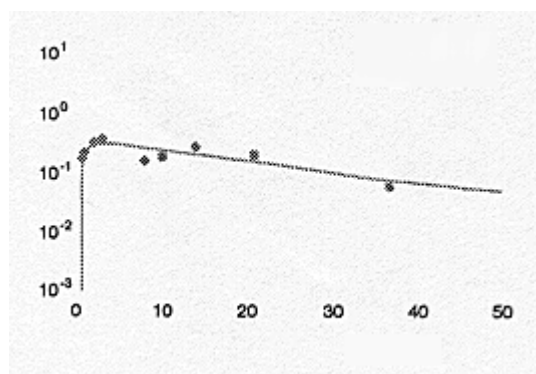


Abb. 3.4.2 VLDL-ApoCIII



Abb. 3.4.3 VLDL-ApoE3



Für ApoB ergibt sich in der VLDL-ApoB-Fraktion eine FCR von 10.4 ± 3.3 pools/d und in der LDL-ApoB-Fraktion 0.35 ± 0.77 pools/d. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Plasmakonzentrationen ergaben sich aus diesen Umsatzraten tägliche Produktionsraten von 17.8 ± 4.5 mg/kg/d für VLDL-ApoB bzw. 13.0 ± 4.1 mg/kg/d für LDL-ApoB. Damit erreichen ca. 2/3 des sezernierten VLDL-ApoB letztendlich die LDL-Fraktion. Das verbleibende Drittel wird als VLDL oder IDL aus dem Plasma eliminiert.

Während die Bestimmung der FCR für ApoCIII bei allen untersuchten Probanden möglich war, konnten für ApoE aufgrund der zu niedrigen Anreicherung nur bei 3 Probanden (Nr.1, 2, 4) verwertbare Daten gewonnen werden. Die Umsatzraten von ApoE3 und ApoCIII lagen dabei mit 1.03 ± 0.11 pools/d bzw. 1.67 ± 1.22 pools/d deutlich unter der des VLDL-ApoB. Damit ergibt sich für ApoE3 eine Produktionsrate (im Ein-Kompartiment-Modell: Produkt aus FCR und Konzentration) von 0.5 ± 0.29 mg/kg/d bzw. für ApoCIII 0.44 ± 0.24 mg/kg/d. und damit weniger als 10% der täglichen ApoB-Produktion (17.8 ± 4.5 mg/kg/d).

Tab. 3.4.1 Kinetische Parameter Probanden Nr. 1 - 6

Kinetische Parameter Probanden Nr. 1 – 6

	FCR (pools/d)	PR (mg/kg/d)	Konzentration (mg/dl)
VLDL-ApoB	10.40 ± 3.3	17.8 ± 4.5	4.67 ± 1.94
VLDL-ApoE3*	1.03 ± 0.11	0.50 ± 0.29	0.62 ± 0.15
VLDL-ApoCIII	1.67 ± 1.22	0.44 ± 0.24	0.85 ± 0.17
LDL-ApoB	0.35 ± 0.77	13.0 ± 4.10	94 ± 15

* Probanden Nr. 1, 2, 4

FCR = fractional catabolic rate
PR = production rate

Bei der Differenzierung der metabolischen Parameter für die Isoformen ApoE4 und ApoE3 (Tab. 3.4.2) liegt die FCR des ApoE4 bei dem Probanden Nr.1 mit 1.45 pools/d deutlich über der FCR des ApoE3 (0.93 pools/d). Als tägliche Produktionsrate ließ sich für ApoE4 0.59mg/kg/d, für ApoE3 0.41mg/kg/d errechnen. Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings, dass die Produktionsrate direkt von der Konzentrationsbestimmung abhängt. Die Konzentrationsangaben für ApoE4 (1.01mg/dl) und ApoE3 (1.09mg/dl) müssen aber als Schätzung angesehen werden.

Die getrennte Darstellung des ApoE3/E4-Stoffwechsels war nur bei einem Probanden (Nr. 1) möglich. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden um einen systematischen Unterschied oder um eine individuelle Besonderheit handelt.

Tab. 3.4.2 Kinetische Parameter ApoE-Isoformen ApoE3 und ApoE4

Kinetische Parameter ApoE-Isoformen Proband Nr. 1

	FCR (pools/d)	PR (mg/kg/d)	Konzentration (mg/dl)
VLDL-ApoE4	1.45	0.59	1.01
VLDL-ApoE3	0.93	0.41	1.09

FCR = fractional catabolic rate
PR = production rate

3.5 Ergebnisse hypertriglyceridämischer Proband (Nr. 7)

Um zu erörtern, ob bei Probanden mit erhöhten Triglyceridspiegeln dieselben Kernaussagen zutreffen, wurde ein Proband mit hypertriglyceridämischem Lipidprofil untersucht.

In Tabelle 3.5.1 sind die klinischen Daten (Alter, BMI, Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, LDL- und HDL-Cholesterin) des Probanden Nr.7 aufgeführt.

Die gemessenen Konzentrationen lagen hier im Mittel für das Gesamtcholesterin bei 172mg/dl, für LDL-Cholesterin bei 75mg/dl und für HDL-Cholesterin bei 23mg/dl. Die im Nüchternplasma bestimmten Triglyceridwerte lagen mit 463mg/dl deutlich im Bereich einer Hypertriglyceridämie.

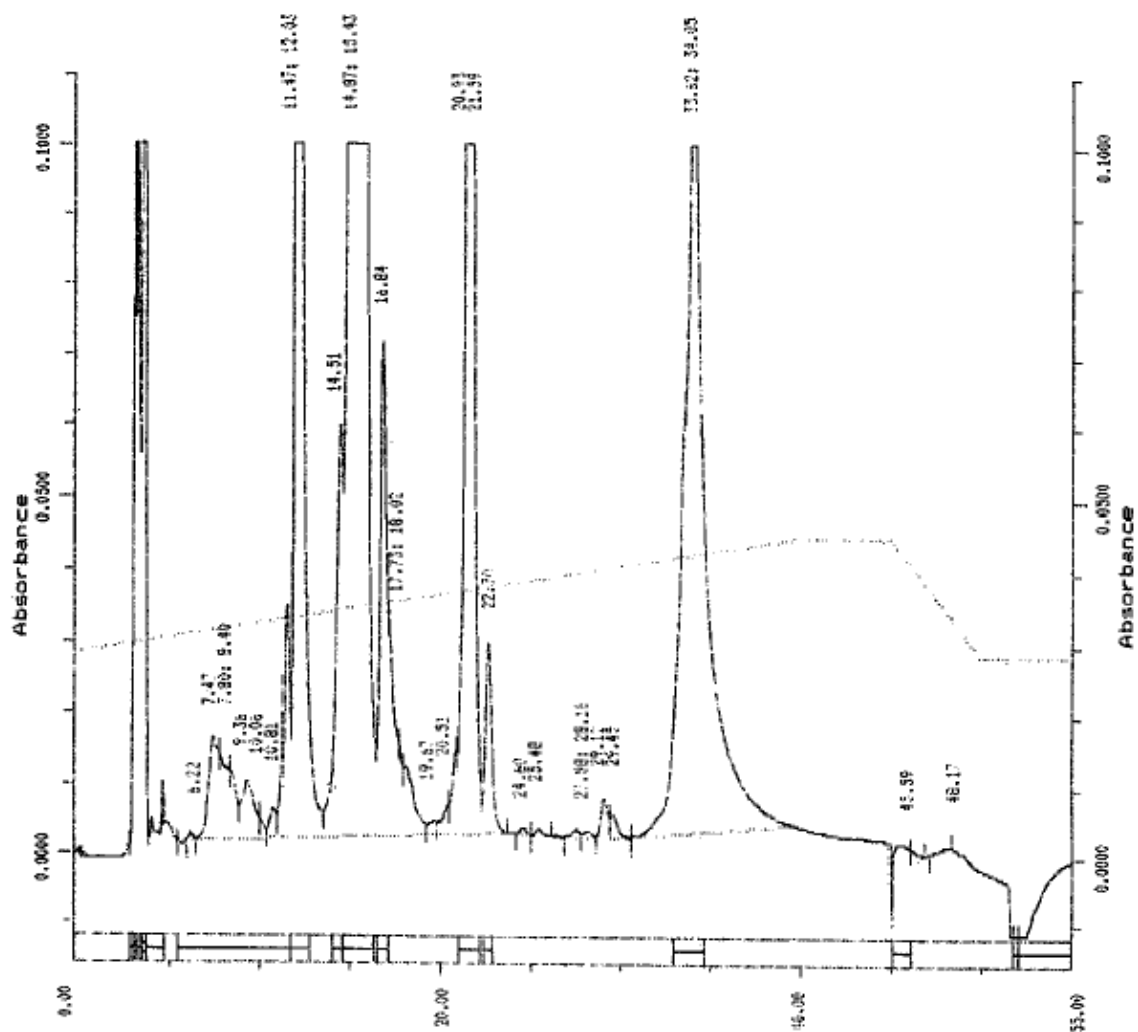
Tab. 3.5.1 Charakterisierung Proband Nr. 7

Charakterisierung Proband Nr. 7

Proband Nr.	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
7	22	26.9	172	463	75	23

Abbildung 3.5.1 zeigt einen HPLC-Lauf dieses Probanden, der sich im Wesentlichen durch deutlich höhere Absorptionswerte (entsprechend den höheren Konzentrationen) von den anderen Probanden unterscheidet. Die hohen Triglyceridspiegel nahmen jedoch keinen Einfluß auf die Differenzierung der einzelnen Apolipoprotein-Fractionen, die gut von einander getrennt und als gut voneinander abgrenzbare Peaks im Chromatogramm dargestellt werden konnten.

Abb. 3.5.1 HPLC-Lauf Proband Nr. 7



Der ApoE-Phänotyp (E3/E3), die in der VLDL-Fraktion bestimmten Konzentrationen von VLDL-Cholesterin und VLDL-Triglyceriden, sowie die Gesamt-VLDL-Protein-Konzentration sind in Tabelle 3.5.2 aufgelistet. Für das VLDL-Cholesterin konnten im Mittel 51mg/dl gemessen werden. Die hohen Plasma-TG-Spiegel finden sich in der Fraktion der triglyceridreichen VLDL wieder. Sowohl die Menge der VLDL-Triglyceride (262mg/dl), als auch des VLDL-Cholesterin (51mg/dl) beträgt ca. das fünffache der Menge bei den Probanden mit Plasma-Triglyceridspiegeln im Normbereich (VLDL-TG: 56mg/dl \pm 12 bzw. VLDL-Chol: 11 \pm 3mg/dl). Der Proteingehalt der untersuchten Lipoproteinfraktion ist mit 23.3mg/dl mehr als viermal so hoch wie bei den Probanden Nr. 1 bis 6 (5.72mg/dl \pm 1.06).

Tab. 3.5.2 VLDL-Konzentrationen Proband Nr. 7

VLDL				
Proband Nr.	ApoE-Phänotyp	VLDL-CHOL (mg/dl)	VLDL-TG (mg/dl)	VLDL-Protein (mg/dl)
7	E3/E3	51	262	23.3

Bei der Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Apolipoproteine in der VLDL-Fraktion setzt sich diese Beobachtung fort (Tab. 3.5.3). Mit 17.71mg/dl ApoB, 1.59mg/dl ApoE3 und 3.81mg/dl ApoCIII liegen die gemessenen Werte bei Proband Nr. 7 um ein vielfaches über denen der Probanden mit niedrigeren Triglyceridspiegeln (ApoB: 4.66mg/dl \pm 0.87; ApoE3: 0.62mg/dl \pm 0.15; ApoCIII: 0.85mg/dl \pm 0.17).

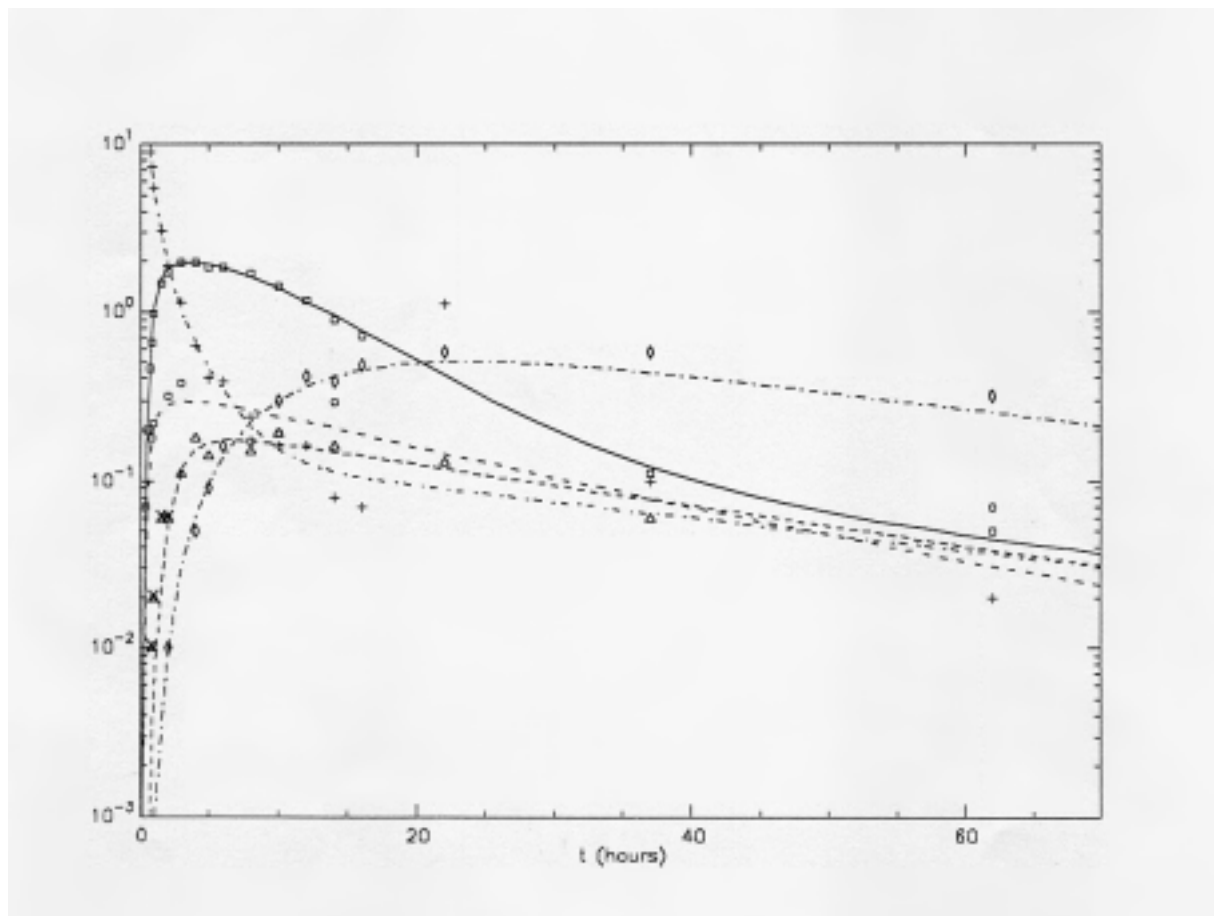
Tab. 3.5.3 VLDL-Apolipoprotein-Konzentrationen Proband Nr. 7

VLDL-ApoB-, ApoE- und ApoCIII-Konzentrationen

Proband Nr.	ApoE-Phänotyp	ApoB (mg/dl)	ApoE3 (mg/dl)	ApoCIII (mg/dl)
7	E3/E3	17.71	1.59	3.81

Die Tracer/Tracee-Ratios des Probanden Nr.7 sind in Abbildung 3.5.2 wiedergegeben. Die im Vergleich zu den normolipämischen Probanden gezeigten Unterschiede im Verlauf der Anreicherungskurven (vgl. Abb. 3.3) werden im Folgenden erörtert.

Abb. 3.5.2 Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 7



	VLDL-ApoB	-----	s1
C	VLDL-ApoE3	-----	s2
8	VLDL-ApoCIII	-----	s4
I	LDL-ApoB	-----	s5
2	Plasma-AS	-----	s6

Im direkten Vergleich zu den Anreicherungskurven der Probanden Nr. 1 – 6 fällt auf, dass das Anreicherungsmaximum des Tracers bei allen VLDL-Apoproteinen ein ähnliches Niveau erreicht, dass die D₃-Leucin-Anreicherung in den einzelnen Apoprotein-Fractionen jedoch deutlich langsamer, mit einer geringeren Geschwindigkeit wieder abfällt. So fallen nach einer raschen, hohen Anreicherung des VLDL-ApoB-Messwerte und berechnete Kurvenpunkte langsamer als bei den normolipämischen Probanden wieder ab. Übereinstimmend mit dem Kurvenverlauf bei den normolipämischen Probanden findet sich im LDL-ApoB hier zunächst eine langsame und im Vergleich zur VLDL-Fraktion deutlich verzögerte Anreicherung der Tracer-Aminosäure, die im Verlauf mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit als im VLDL-ApoB wieder absinkt.

Für die Apolipoproteine VLDL-ApoE3 und VLDL-ApoCIII konnten bei diesem hypertriglyceridämischen Probanden folgenden Beobachtungen gemacht werden: Nach im Vergleich zu ApoB ähnlich raschem Anstieg, erreicht die gemessene Anreicherung des D₃-Leucins in der ApoCIII- und ApoE3-Fraktion ein deutlich niedrigeres Maximum als in VLDL-ApoB und fällt dann mit geringerer Geschwindigkeit wieder ab. Die Daten von ApoCIII und ApoE sind dabei, wie bereits bei den normolipämischen Probanden beobachtet, weder untereinander, noch mit denen des ApoB identisch. Darüber hinaus aber zeigen die Anreicherungskurven dieser Apoproteine bei ähnlichem Ausgangsniveau einen wesentlich flacheren weiteren Kurvenverlauf als bei den normolipämischen Probanden.

In Tab. 3.5.4 sind Fraktionale Katabolismusraten und Produktionsraten für die einzelnen Apolipoproteine bei Proband Nr. 7 aufgeführt. Hier zeigt sich, dass die FCR für VLDL-ApoB bei Proband Nr. 7 mit 2.19pools/d etwa 20% der VLDL-ApoB-FCR der normolipämischen Probanden (10.40 ± 3.3 pools/d) ausmacht. Obwohl die VLDL-ApoB-Konzentration bei Proband Nr.7 mit 17.71mg/dl ein mehrfaches der bei den Normolipämikern bestimmten VLDL-ApoB-Konzentration (4.67 ± 1.94 mg/dl) beträgt, entspricht die aus FCR und Konzentration berechnete tägliche Apoprotein-Produktionsrate mit 15.5mg/kg/d größenordnungsmäßig der Produktionsrate bei den Probanden Nr.1 - 6 (17.8 ± 4.5 mg/kg/d). Bei VLDL-ApoCIII liegt die Umsatzrate mit 0.82pools/d deutlich unter den bei den normolipämischen Probanden beobachteten Werten (1.67 ± 1.22 pools/d). Bei einer mehr als vierfachen VLDL-ApoCIII-Konzentration bei Proband Nr. 7 (3.81mg/dl vs. 0.85 ± 0.17 mg/dl) lässt sich daraus eine tägliche Produktionsrate von 1.25mg/kg/d errechnen, die beinahe das dreifache der Produktionsrate bei den normolipämischen Probanden (0.44 ± 0.24 mg/kg/d) beträgt. Für VLDL-ApoE3 konnten bei einer VLDL-ApoE-Konzentration von 1.59mg/dl eine FCR von 1.19pools/d und eine Produktionsrate von 0.76mg/kg/d bestimmt werden. Diese Parameter erscheinen mit denen bei den normolipämischen Probanden erhobenen Parametern (FCR 1.03 ± 0.11 pools/d, PR 0.50 ± 0.29 mg/kg/d) vergleichbar.

Beim Vergleich der LDL-ApoB-Daten konnte bei einer LDL-ApoB-Konzentration von 74.5mg/dl eine FCR von 0.67pools/d und eine Produktionsrate von 19.96mg/kg/d ermittelt werden. Diese Daten zeigen gegenüber den Daten der normolipämischen Probanden (FCR 0.35 ± 0.77 ; PR 13.0 ± 4.10) sowohl einen höheren Umsatz des Apoprotein-Pools als auch eine höhere Apoproteinproduktionsrate.

Für die untersuchten VLDL-Apoproteine ApoB, ApoCIII und ApoE bei einem hypertriglyceridämischen Probanden gelten neben den beobachteten Unterschieden zu den Probanden Nr. 1- 6 gleichzeitig die bereits ausführlich beschriebenen Unterschiede in Traceranreicherung und metabolischen Parametern (siehe 3.2).

Tab. 3.5.4 Kinetische Parameter Proband Nr. 7

Kinetische Parameter Proband Nr. 7

	FCR (pools/d)	PR (mg/kg/d)	Konzentration (mg/dl)
VLDL-ApoB	2.19	15.5	17.71
VLDL-ApoE3	1.19	0.76	1.59
VLDL-ApoCIII	0.82	1.25	3.81
LDL-ApoB	0.67	19.96	74.5

4. Diskussion

Die Verwendung mit stabilen Isotopen markierter Substanzen, die als endogene Tracer in den Stoffwechsel eingeschleust werden, stellt für in-vivo-Untersuchungen des Metabolismus der Lipoproteine bzw. der Apolipoproteine eine etablierte Methodik dar (Cryer et al, 1986; Cohn et al, 1990; Lichtenstein et al, 1990; Parhofer et al, 1991; Barrett et al, 1996; Demant et al, 1996; Patterson et al, 1997; Pont et al, 1998).

Wenn ein endogener Tracer (z. B. markierte Aminosäuren) in vivo in Proteine eingebaut wird, können Daten u. a. über Produktion und täglichen Umsatz verschiedener Proteine gewonnen werden, ohne dass physiologische Vorgänge beeinträchtigt werden. Der Vorteil der Verwendung endogener Tracer besteht also vor allem darin, dass das Steady-state von außen nicht gestört wird, und der Stoffwechsel der zu untersuchenden Proteine unbeeinträchtigt bleibt. Daneben kann der Stoffwechsel einer unbegrenzten Anzahl von Proteinen gleichzeitig untersucht werden. Die im Vergleich zur exogenen Markierung relativ aufwendige Methodik beinhaltet jedoch den Nachteil, dass der Metabolismus langsam verstoffwechselter Proteine (z. B. LDL) nur schlecht bestimmt werden kann. Hier ist eine Unterscheidung von Produkt- und Precursor-Umsatzrate manchmal nur schwer möglich. Zudem existieren in-vivo zwischen VLDL, IDL und LDL keine strikten Precursor-Produkt-Beziehungen, so dass weitere Stoffwechselwege, wie eine direkte Sekretion der dichter Lipoproteine (Kesaniemi et al, 1982; Beltz et al, 1990) oder ein Shunt-Pathway zwischen VLDL und LDL nicht getrennt darstellbar sind (Beltz et al, 1985; Parhofer et al, 1991).

Bei der Verwendung exogener Tracer wird nur der interessierende Partikel in-vitro meist radioaktiv markiert und in den Stoffwechsel von außen eingeschleust. Mit dieser einfachen Methodik kann jedoch nur der Stoffwechsel des markierten Partikels beobachtet werden. Der Stoffwechsel schnell metabolisierter Partikel ist dabei teilweise nur schwer erfassbar (Beltz et al, 1985 und 1990). Im Gegensatz zur Benutzung endogener Tracer ist hier der Stoffwechsel von Tracer und Tracee nicht zwingend identisch, da Isolierung und Markierung den Partikel verändern können (Ramakrishnan et al, 1990).

Neben den Bedenken, die gegen die Verwendung radioaktiver Substanzen bei Versuchspersonen sprechen, hat sich aus diesen Gründen in den letzten Jahren zunehmend die Verwendung mit stabilen Isotopen markierter Substanzen als endogene Tracer in der Untersuchung des Lipoproteinstoffwechsels durchgesetzt.

Voraussetzung für eine sinnvolle Interpretation von Stoffwechsel-Daten ist, dass bei der Untersuchung standardisierte Bedingungen herrschen. Für die Untersuchung des Apolipoprotein-Stoffwechsels gilt heute, dass weder die Art der Aminosäure (Lichtenstein et al, 1990, Parhofer et al, 1991) noch die Methode der Tracer-Applikation eine wesentliche

Rolle spielt, solange das Steady-State nicht gestört wird. So konnte von Parhofer et al (1991) in einer vergleichenden Studie gezeigt werden, dass sich keine signifikanten Unterschiede bei der Ermittlung kinetischer Parameter durch die Applikation des Tracers als Bolus bzw. als kontinuierliche Infusion ergeben. Da eine einmalige Injektion der Tracersubstanz zu Beginn des Untersuchungszeitraumes eine technisch wesentlich weniger aufwendige und besser reproduzierbare Methodik darstellt, wurde in der vorliegenden Turn-over-Studie die Tracer-Aminosäure, D₃-Leucin, als Bolus in einer Menge von 5mg pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht.

Das Einbringen einer Tracer-Aminosäure bedeutet jedoch, dass der verwendete Marker in all jenen neu-synthetisierten Proteinen des Körpers wiederzufinden ist, die ihre Bausteine aus dem Pool der Plasma-Aminosäuren rekrutieren. In diesem Zusammenhang wird klar, dass die Isolation der zu untersuchenden Lipoprotein-Fraktionen bzw. Apolipoproteine eine entscheidende Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Lipoprotein-Fraktionen nach ihrer Dichte über Ultrazentrifugation voneinander abgetrennt. Dieses Verfahren ist die Grundlage für die Differenzierung der einzelnen Lipoproteinfraktionen. Danach werden die einzelnen Lipoproteinklassen aufgrund ihrer Eigendichte in Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL), niedriger (Low Density Lipoproteins, LDL), intermediärer (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) bzw. sehr niedriger Dichte (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) eingeteilt. Über präparative Ultrazentrifugation wurden in dieser Studie die Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL isoliert und in den einzelnen Lipoproteinfraktionen der Apoproteinanteil weiter untersucht.

Dazu wurde ApoB aus der VLDL- und LDL-Fraktion durch Präzipitation isoliert. Dieses Verfahren wurde bereits in zahlreichen früheren Arbeiten (Cohn et al, 1990; Parhofer et al, 1991; Patterson et al, 1991; Demant et al, 1996; Parhofer et al, 1996; Parhofer et al, 2000; Packard et al, 2000) verwendet und erwies sich für die Isolation des ApolipoproteinB als sehr gut geeignet.

Die Isolation der anderen VLDL-Apolipoproteine kann über unterschiedliche Methoden erfolgen. Die Isolation mittels Gel-Elektrophorese, z. B. über präparative Isoelektrische Focussierung (IEF) auf einem Polyacrylamid-Gel (Cohn et al, 1990; Patterson et al, 1991; Fisher et al, 1991; Parhofer et al, 1992; Demant et al 1996; Batal et al, 2000), oder die automatisierte Gel-Filtrations-Chromatographie mittels FPLC (Fast Protein Liquid

Chromatography) (Fredenrich et al, 1997) stellen mögliche Alternativen der Apolipoprotein-Auftrennung dar.

In dieser Arbeit wurde eine weitere Methodik zur Apoprotein-Isolation vorgestellt. Mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) konnten in der VLDL-Fraktion die Gruppe der nicht-ApoB-Apolipoproteine gut voneinander getrennt werden (Abb. 2.3). Über dieses Verfahren konnten sowohl die Apolipoproteine ApoCI, ApoCIII und ApoCII, als auch ApolipoproteinE mit seinen Isoformen ApoE3 und ApoE4 isoliert werden. Dabei zeigte sich, dass die Qualität der Abtrennung der ApoE-Isoformen von der Menge an Apoprotein in der Probe beeinflusst wird. Die Konzentration des VLDL-ApoCIII und -ApoE korreliert direkt mit dem Plasma-Triglycerid-Spiegel. Bei Probanden mit hypertriglyceridämischem Lipidprofil können in den triglyceridreichen Lipoproteinfraktionen höhere ApoCIII- und ApoE-Werte bestimmt werden als bei Probanden mit Triglyceridspiegeln im Normbereich (Berman et al, 1978, Curry et al, 1980; Huff et al, 1981; Fredenrich et al, 1997; Huang et al, 1998, Batal et al, 2000). Die ApoCIII- und ApoE-Konzentrationen bei Probanden mit Hypertriglyceridämie oder Dysbetalipoproteinämie sind um ein Vielfaches höher als die Konzentrationen dieser Apoproteine bei Normolipämikern. Bei hohen Apolipoprotein-Konzentrationen – in der vorliegenden Arbeit an Proband Nr. 7 demonstriert – ist die Auftrennung über die HPLC weniger störungsempfindlich. Andere in den Proben vorhandene Plasmaproteine oder degradierte Apolipoproteine, die durch die Probenpräparation nicht vollkommen entfernt werden konnten, beeinflussen die Differenzierung der Apoproteine kaum. Bei Proband Nr. 3 mit sehr niedrigen Plasma-Triglycerid-Werten (65mg/dl) lagen die Konzentration des VLDL-ApoCIII bei 0.53mg/dl und die Konzentration des VLDL-Gesamt-ApoE (d.h. ApoE3 und ApoE4) bei 0.43mg/dl. Bei der Auftrennung der einzelnen Apoproteine ergaben sich bei diesen sehr niedrigen Proteinkonzentrationen so niedrige Absorptionswerte, dass in diesem Fall eine sichere Differenzierung der ApoE-Isoformen ApoE3 und ApoE4 nur bei einzelnen HPLC-Läufen möglich war.

Letztlich zeigen aber die hier vorgestellten Untersuchungen, dass auch bei Normolipämikern mit Triglycerid-Spiegeln unter 180mg/dl eine Isolation der verschiedenen Apoproteine, ApoCI, ApoCIII, ApoCII und ApoE, über HPLC grundsätzlich gelingt, wenngleich bei sehr niedrigen Triglycerid-Spiegeln die Auftrennung der ApoE-Isoformen nur bedingt möglich erschien. Im Vergleich mit den oben angesprochenen Isolations-Verfahren ist eine Auftrennung der VLDL-Apolipoproteine über HPLC dennoch eine weitere Alternative.

In der vorliegenden Arbeit lagen die Plasmakonzentrationen für VLDL-ApoB bei 4.66 ± 0.87 mg/dl, für VLDL-ApoE3 bei 0.62 ± 0.15 mg/dl und für ApoCIII bei 0.85 ± 0.17 mg/dl. Die bestimmten Konzentrationen der Apoproteine entsprechen größenordnungsmäßig den

Ergebnissen anderer Studien (Berman et al, 1978; Beltz et al, 1985; Cohn et al, 1990; Parhofer et al, 1991; Barrett et al, 1991; Fredenrich et al, 1997; Batal et al, 2000). Für ApoCIII und ApoE werden tendentiell höhere Konzentrationen angegeben. Hier ist jedoch zu beachten, dass bei der ApoE-Konzentrations-Bestimmung nicht immer eindeutig zwischen den Isoformen ApoE3 und ApoE4 unterschieden, sondern meist die Gesamt-ApoE-Konzentration bestimmt wird. In dieser Arbeit wurde die ApoE3-Konzentration bei den Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E4 (Nr.1 und Nr.3) aus dem Chromatogramm als prozentualer Anteil (52% bzw. 40%) des Gesamt-ApoE geschätzt. Für die ApoCIII-Konzentrationen muß berücksichtigt werden, dass ebenfalls keine exakte Bestimmung der Apoprotein-Konzentration – z. B. mit einem ELISA-Testverfahren - durchgeführt wurde, sondern die Konzentration wiederum anteilmäßig (63-73% des VLDL-Nicht-ApoB) aus den Chromatogrammen abgeschätzt wurde. Für grundsätzliche Aussagen zur Interpretation der kinetischen Parameter können diese Abweichungen dennoch vernachlässigt werden (s. u.).

Die mit der Massenspektrometrie gemessenen Anreicherungsdaten der markierten Aminosäure zeigen das Erscheinen der Tracer-Aminosäure im untersuchten Apoprotein. So kann nach dem Tracerbolus zunächst ein Anstieg, dann ein Abfall der Traceranreicherung im untersuchten Apoprotein beobachtet werden. Der Anstieg und Abfall der Anreicherung hängt dabei von folgenden Variablen ab: Angebot an markierter Aminosäure (am Syntheseort), Produktions- und Abbaurate, sowie Poolgröße des untersuchten Proteins (Konzentration). Da als Grundlage dieser Untersuchung die Annahme eines Steady-States gilt, entspricht die Abbaurate des Proteins seiner Produktionsrate.

Damit können anhand der Anreicherungskurven nach Abschätzung des Angebots der markierten Aminosäuren am Syntheseort (über Bestimmung der Anreicherung an freier markierter Aminosäure) und der Proteinkonzentration prinzipiell Produktions- und Abbauraten bestimmt werden. Bei komplexen Systemen ist dies ohne ein computergestütztes Modelling nicht möglich. Diese Modelle stellen Hypothesen zum Stoffwechsel des untersuchten Apoproteins dar und bestehen aus einer definierten Anzahl an Kompartimenten und gerichteten Stoffwechselwegen. In Anlehnung an bisher publizierte Arbeiten zum Apoprotein-Stoffwechsel (Beltz et al, 1985, Beltz et al 1990; Barrett et al, 1991; Fisher et al, 1991; Parhofer et al, 1993; Demant et al, 1994; Packard et al, 1995; Demant et al, 1996) wurde das in Abb. 2.4 dargestellte Multi-Kompartiment-Modell verwendet.

Im vorliegenden Modell schließen sich an das 4 Kompartimente umfassende Submodell der Plasma-Aminosäuren zunächst Verzögerungs-Kompartimente an, die Neusynthese, Zusammenbau und Sekretion der Apoproteine beschreiben. Der VLDL-ApoB-Stoffwechsel

ist mit zwei Kompartimenten beschrieben, von denen eines eine hohe Umsatzrate hat. Das zweite Kompartiment mit einer niedrigeren Umsatzgeschwindigkeit wird im Sinne einer Mini-Delipidierungskaskade aus dem ersten VLDL-Kompartiment mit der höheren Umsatzrate gespeist. Hier wurde auf einen mehrschrittigen Delipidierungsprozess (Beltz et al, 1990; Fisher et al, 1991; Packard et al, 1995; Parhofer et al, 1996; Parhofer et al, 2000) mit aneinander gekoppelten Kompartimenten, sowie auf eine Unterscheidung zwischen VLDL₁ und VLDL₂ (Packard et al, 1995; Demant et al, 1996; Batal et al, 2000) verzichtet, alle Parameter aber als variabel behandelt. Das markierte ApoB aus dem langsam umgesetzten VLDL-Kompartiment erscheint nach entsprechender Latenz in der durch ein einzelnes Kompartiment mit einer niedrigen Umsatzgeschwindigkeit charakterisierten LDL-Fraktion. Die IDL-Fraktion wurde nicht gesondert untersucht und daher auch im Modelling nicht berücksichtigt. Um das relativ schnelle Erscheinen des ApoB in der LDL-Fraktion ausreichend erklären zu können, wurde eine zusätzliche Verbindung des LDL-Kompartiments mit dem VLDL-Kompartiment mit der hohen Umsatzgeschwindigkeit postuliert. Dieser sogenannte Shunt-Pathway wurde bereits 1985 von Beltz et al als ein von der Delipidierungskaskade unabhängiger Mechanismus beschrieben und von Parhofer et al 1991 bestätigt. Die erhobenen Daten ermöglichen für den LDL-ApoB-Stoffwechsel lediglich ein Modell mit einem Kompartiment. In anderen Arbeiten (Fisher et al, 1991; Demant et al, 1991; Packard et al, 1995; Demant et al, 1996) konnte gezeigt werden, dass für LDL-ApoB ein Modell mit mindestens zwei Kompartimenten postuliert werden kann. In einem solchen Modell repräsentieren diese Kompartimente meist einen intra- und einen extravaskulären Pool an LDL-ApoB, die über Austausch-Mechanismen miteinander in Verbindung stehen. Die sehr vereinfachende Darstellung durch ein Ein-Pool-Modell lässt offen, ob die LDL-Fraktion neben den Zuflüssen aus den VLDL-Kompartimenten zumindest auch zu einem kleinen Teil direkten Input aus der Leber mit neu synthetisierten Partikeln erhält. Das frühe Erscheinen des markierten ApoB in der LDL-Fraktion ist sowohl durch eine direkte Sekretion aus den Hepatozyten, als auch durch einen Shunt-Weg aus dem VLDL-Kompartiment mit der hohen Umsatzrate erklärbar (Demant et al, 1996). Eine exakte Differenzierung dieser beiden Stoffwechselwege ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich.

Die Qualität der Daten für die Apolipoproteine ApoCIII und ApoE lassen ein mehrere Kompartimente umfassendes Modell nicht zu. Der VLDL-ApoCIII- und VLDL-ApoE3-Stoffwechsel wurde daher jeweils durch ein Kompartiment beschrieben. Damit bleibt noch offen, ob lediglich die unzureichende Datenqualität die Entwicklung eines komplexeren Modells verhindert, oder ob der Stoffwechsel dieser Apoproteine tatsächlich mit nur einem Kompartiment in der VLDL-Fraktion vollständig erfasst wird. Batal et al verwenden in neueren Untersuchungen ein Drei-Pool-Modell für VLDL-ApoB, VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE. Das

erste Kompartiment entspricht dem Plasma-Aminosäuren-Precursor-Pool, an das sich ein Verzögerungskompartiment anschließt. Das dritte Kompartiment stellt das Plasma-Protein-Kompartiment dar. Auch in der Studie von Batal et al war es nicht möglich, den Metabolismus von VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE durch mehrere Kompartimente zu definieren. Der Vergleich mit den Modellen zum VLDL-ApoB-Stoffwechsel lässt jedoch stark vermuten, dass ein Ein-Pool-Modell die Heterogenität des VLDL-ApoCIII- und VLDL-ApoE-Metabolismus, sowie die Interaktion mit anderen Lipoproteinen (s. u.) nicht vollständig beschreibt.

Der Vergleich der Tracer-Daten zeigt dennoch sehr eindrucksvoll, dass sich die einzelnen Apolipoprotein-Klassen, ApoB, ApoE3 und ApoCIII, in der Anreicherungs geschwindigkeit und hinsichtlich ihres spezifischen Anreicherungsmaximums, sowie im weiteren zeitlichen Verlauf wesentlich voneinander unterscheiden. Die unter 3.3 beschriebenen Kurven der Tracer-Anreicherung machen deutlich, dass die Geschwindigkeit, mit der das markierte Leucin in VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE3 eingebaut wird, ähnlich der des ApoproteinB ist, und die Tracer-Aminosäure in diesen Apolipoprotein-Fractionen nach nur kurzer Latenz erscheint. Die maximale Anreicherung des D₃-Leucins im VLDL-ApoB erreicht ein deutlich höheres Niveau als in VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE3. Im weiteren Verlauf fällt die Anreicherung in ApoCIII und ApoE3 im Vergleich zu ApoB deutlich langsamer ab, d. h. die Geschwindigkeit, mit der der gesamte Pool an ApoCIII bzw. ApoE im VLDL umgesetzt wird, liegt wesentlich unter der des ApoB.

Daraus lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

Der VLDL-Stoffwechsel wird typischerweise durch Beschreibung des ApoB-Metabolismus charakterisiert. Jeder neu synthetisierte VLDL-Partikel, repräsentiert durch je ein ApoB-Molekül, ist zusätzlich mit einer variablen Anzahl an ApoCIII- und ApoE-Molekülen ausgestattet. Der Vergleich der Tracer-Anreicherungskurven der verschiedenen Apoproteine lässt folgende Überlegungen zu: Wenn die Apolipoproteine ApoE bzw. ApoC am gleichen Ort gebildet würden wie ApoB und auch jeweils mit dem ApoB-Molekül zusammen verstoffwechselt würden, dann müssten die Tracer-Kurven identisch sein. Wären die Kurven parallel, aber nicht identisch, würde das dafür sprechen, dass der Stoffwechsel der verschiedenen Apoproteine an sich zwar gleich ist, aber unterschiedliche Bildungsorte existieren. Die Tatsache jedoch, dass die Tracer-Kurven der untersuchten Apoproteine eben nicht identisch sind, lässt sich so interpretieren, dass die Apolipoproteine unterschiedliche Stoffwechselwege verfolgen. Dass in jedem VLDL neben ApoB aber auch andere Apoprotein-Klassen nachweisbar sind, bedeutet weiter, dass es intermittierend – und das kann einem Großteil der intravasalen Lebenszeit entsprechen - zu einer Assoziation der

verschiedenen Apoproteine kommt, dass sie letztendlich aber unterschiedliche Stoffwechselwege haben.

Der unter 3.4 angestellte Vergleich der kinetischen Parameter zeigt weiter, dass sich sowohl Produktionsrate, als auch Umsatzrate der Apolipoproteine ApoCIII und ApoE signifikant von der des ApoB unterscheiden. Fänden sich für alle Apoproteine identische Produktionsraten, ergäbe sich daraus die Folgerung, dass in jedem von der Leber sezernierten VLDL-Partikel mit jedem ApoB-Molekül dieselbe definierte Menge an ApoCIII und ApoE enthalten wäre. Die Produktionsraten des ApoCIII ($0.44 \pm 0.24 \text{ mg/kg/d}$) bzw. des ApoE3 ($0.5 \pm 0.29 \text{ mg/kg/d}$) liegen jedoch deutlich unter der des ApoB ($17.8 \pm 4.5 \text{ mg/kg/d}$). Der Komplex aus verschiedenen Apolipoproteinen müsste bei übereinstimmenden Umsatzraten während der Zirkulation durch den Organismus auch in der spezifischen Apoprotein-Zusammensetzung unveränderlich bleiben und durch dieselben Mechanismen, die man für den VLDL-ApoB-Stoffwechsel annimmt, wieder eliminiert werden. Wenn man aber davon ausgeht, dass der ApoB-Anteil der VLDL eng mit dem Schicksal der VLDL-Moleküle verbunden ist, bedeuten die unterschiedlichen metabolischen Parameter der Apoproteine ApoCIII und ApoE, dass ihre Verstoffwechslung von ApoB unabhängig sein muss. Die wesentlich niedrigeren Umsatzraten der beiden Apoprotein-Fraktionen ($\text{FCR} = 1.03 \pm 0.11 \text{ pools/d}$ für ApoE3 bzw. $\text{FCR} = 1.67 \pm 1.22 \text{ pools/d}$ für ApoCIII) zeigen, dass im Vergleich zu ApoB ($\text{FCR} = 10.4 \pm 3.3 \text{ pools/d}$) ein wesentlich geringerer Anteil des gesamten Apolipoprotein-Pools ausgetauscht wird. Während der gesamte VLDL-ApoB-Pool also innerhalb von 24h ca. 10mal komplett ersetzt wird, wird der Plasma-Pool an VLDL-ApoE3 und VLDL-ApoCIII täglich im Mittel einmal bzw. ca. 1.5mal erneuert.

Diese Beobachtungen sind zusammenschauend vereinbar mit der Vorstellung, dass die Apoproteine ApoCIII und ApoE eben nicht als ein starrer Komplex an das ApoB gebunden sind, sondern als mobile Komponenten der Lipoprotein-Struktur ausgetauscht und verändert werden können. Die zentrale Frage bleibt hier, woher diese Apoproteine rekrutiert werden.

Anhand von Untersuchungen an 6 normolipämischen, männlichen Probanden stellten Millar et al (1998) einen Vergleich zwischen verschiedenen Multi-Kompartiment-Modellen zum ApoE-Stoffwechsel an. In dieser Studie konnten die erhobenen Daten am besten mit einem Modell erfasst werden, in dem der Pool an triglyceridreichen Lipoproteinen zum einen aus einem dem HDL entsprechenden Kompartiment, zum anderen aus einem als extravaskulären Pool bezeichneten Kompartiment Zufluß erhält. Die Tracer-Anreicherung erreichte im VLDL-ApoE zwei Maxima: nach 0.5 bzw. nach 6h. Diese Daten wurden im

Modell als zwei separate Inputs in das VLDL-ApoE beschrieben. Neben der hepatischen Apoprotein-Produktion wurde hier ein unabhängiges extravaskuläres Kompartiment postuliert, das vor allem die späte Anflutung des Tracers in der untersuchten Apoprotein-Fraktion erfassen soll. Ein bidirektionaler Austausch zwischen VLDL und diesem extravaskulären Pool findet in diesem Modell nicht statt. Die Autoren übertragen dieses Modell ebenfalls auf den ApoC-Stoffwechsel. Im Gegensatz zu ApoE scheinen die Apolipoproteine Klasse C den Intravasalraum jedoch nicht zu verlassen. Die Autoren vermuten als physiologisches Korrelat für diesen extravasalen Pool am ehesten eine Verbindung zum Lymphsystem. Fraglich ist jedoch, ob dieses extravaskuläre Kompartiment im Apolipoprotein-Stoffwechsel tatsächlich eine so große Rolle spielt, wie im beschriebenen Modell angenommen. Bei dem im Verhältnis relativ kleinen Austausch zwischen VLDL und HDL wäre dieses konstruierte Kompartiment das Hauptreservoir extrahepatisch gespeicherter Apoproteine. Nach diesen Untersuchungen würde der Großteil des VLDL-ApoE aus eben diesem extravasalen Pool stammen. Diese Hypothese scheint jedoch mit den Vorstellungen über die tatsächlichen Stoffwechselwege der Lipoproteine und Apoproteine nur schwer vereinbar. Auch die Funktion der Apoproteine in diesem Kompartiment bleibt ungeklärt.

Eine andere Quelle der VLDL-Apoproteine könnte die Interaktion mit anderen Lipoproteinfraktionen darstellen.

Batal et al zeigen, dass mindestens 50% der Plasma-Konzentration an ApoCIII und ApoE direkt mit neusynthetisierten VLDL-Partikeln ins Plasma sezerniert werde. Neben dieser hepatischen Neuproduktion müssten diese Apoproteine auch aus anderen Quellen rekrutiert werden. Ein Austausch von Apoproteinen zwischen den Lipoproteinen, v. a. zwischen VLDL und HDL, würde eine mögliche Quelle darstellen.

Die Beobachtung, dass ca. die Hälfte der neusynthetisierten Apoproteine direkt an das Schicksal der VLDL-Partikel gebunden sind, deckt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Hier entsprachen die Produktionsraten der Apoproteine ApoCIII und ApoE3 weniger als 10% der ApoB-Produktionsraten. Damit lassen sich auch die von Batal et al gezogenen Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen nicht bestätigen. Das Schicksal der Apoproteine ApoCIII und ApoE scheint hier vom Stoffwechsel des ApolipoproteinB und damit auch vom VLDL-Stoffwechsel im großen Maße unabhängig zu sein. In welchem Ausmaß v. a. HDL ein Reservoir an ApoE oder ApoC für neusynthetisierte VLDL-Partikel darstellt, müsste in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. So wären Turn-over-Studien mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methodik auch für HDL denkbar.

Da ApoCIII und ApoE nicht vollkommen zwischen VLDL und HDL austauschbar sind (Mahley et al, 1999; Rensen et al, 2000), müssen andere Alternativen als Apoprotein-Reservoir diskutiert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt z. B. ein Pool an Apoproteinen dar, die frei im Plasma zirkulieren und bei Bedarf in neu von der Leber sezernierte VLDL-Partikel eingebaut werden. Eine weitere Hypothese beschreibt den Weg der sogenannten ApoE-Endozytose. So deuten neuere in-vitro-Daten darauf hin, dass in die Zellen aufgenommene Apoproteine intrazellulär nicht in den Lysosomen sofort abgebaut, sondern wieder sezerniert und in den VLDL-Stoffwechsel eingeschleust werden können (Mahley et al, 1999; Demant et al, 1998; Rensen et al, 2000).

Im Sinne eines fortlaufenden Transfers und Austausch zwischen den Lipoproteinfraktionen unterschiedlicher Dichte und anderen intra- und extravaskulären Pools sind also die ApoE- und ApoC-Moleküle nicht zwingend mit dem Schicksal einer Lipoprotein-Fraktion verbunden, sondern stellen eine Variable in der jeweiligen Lipoprotein-Zusammensetzung dar. Das bedeutet weiter, dass die Elimination eines VLDL-Partikels aus der Zirkulation nicht notwendigerweise mit einer Katabolisierung der ApoCIII- und ApoE-Moleküle gleichzusetzen ist. Vielmehr lässt sich aus den vorliegenden Untersuchungen der Schluß ziehen, dass die Apoproteine ApoCIII und ApoE mehr als einmal durch den VLDL-Pool zirkulieren und vor ihrer Degradation Bestandteil mehrerer VLDL-Partikel werden können. Damit würde ein Transfer von Apolipoproteinen nicht nur zwischen den unterschiedlichen Lipoprotein-Fraktionen, z. B. zwischen VLDL und HDL, stattfinden, sondern auch zwischen einzelnen VLDL-Partikeln. Damit können die Apoproteine ApoCIII und ApoE während ihrer Verweildauer in der Zirkulation auch Bestandteil mehr als nur eines VLDL-Moleküls sein, bevor sie in der Leber abgebaut werden.

Bei einem Probanden (Nr.1) dieser Turn-over-Studie konnten zusätzlich die metabolischen Parameter für die ApoE-Isoformen ApoE3 und ApoE4 getrennt ermittelt werden. Die Tracer-Anreicherung der beiden Isoformen zeigten hier ebenfalls keinen identischen Verlauf. Der Anteil der jeweiligen ApoE-Isoform wurde bei diesem Probanden mit 52% für ApoE3 bzw. 48% ApoE4 am Gesamt-VLDL-ApoE aus dem Chromatogramm geschätzt. Die damit errechneten Produktionsraten lagen für ApoE3 bei 0.41mg/kg/d und für ApoE4 bei 0.59mg/kg/d. Ein deutlicher Unterschied ergab sich beim Vergleich der Umsatzraten der beiden Isoformen. So entspricht die FCR des ApoE3 (0.93pools/d) größenordnungsmäßig den Werten, die bei den Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E3 (1.03 ± 0.11 pools/d) ermittelt wurden. Demgegenüber war der tägliche Umsatz an ApoE4 (FCR = 1.45pools/d) deutlich höher, etwa im Bereich der für ApoCIII ermittelten Umsatzraten (FCR ApoCIII 1.67 ± 1.22 pools/d). Analog zu den Vergleichen zwischen ApoB und den Apoproteinen ApoCIII und

ApoE3 bedeutet dies, dass im Vergleich zu ApoE4 pro Tag ein größerer Anteil des gesamten ApoE4-Pools ausgetauscht wird. Der wesentliche Unterschied der beiden Isoformen scheint damit die höhere Umsatzrate von ApoE4 gegenüber ApoE3 zu sein. Aufgrund der sehr niedrigen Anreicherungen bei dem zweiten Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E4 (Nr. 3) konnten hier die beiden Isoformen nicht getrennt analysiert werden. So bleibt in dieser Untersuchung offen, ob die unterschiedlichen kinetischen Parameter von ApoE4 und ApoE3 einen individuellen Befund (Prob. Nr. 1) darstellen, oder es sich hier um einen systematischen Unterschied handelt. Die Ergebnisse stimmen jedoch mit Beobachtungen von Gregg et al (1988) überein, die einen schnelleren Umsatz von ApoE4 im Vergleich zu ApoE3 in-vivo nachweisen konnten. Ursächlich hierfür könnte zum einen eine größere Affinität der ApoE4-Moleküle zu triglycerid-reichen Lipoproteinen (v.a. VLDL) sein (Dong et al, 1996). Der Grund hierfür scheint die durch die ausgetauschten Aminosäuren - in ApoE4 findet sich an den Positionen 112 und 158 jeweils Arg anstelle von Cys¹¹² und Arg¹⁵⁸ bei ApoE3 - veränderte Proteinkonfiguration zu sein, die die Bindung des carboxyterminalen Endes, der lipidbindenden Domäne des Proteins, an Lipoprotein-Strukturen begünstigt. ApoE3 kann – ebenso wie ApoE2 - über seinen Cystinrest über Disulfidbrücken stabilisierte Multimere (z.B. ApoE-AII-Heterodimere) ausbilden. Da ApoE4 keinen Cystinrest besitzt, liegt ApoE4 im Plasma fast ausschließlich als Monomer vor (Weisgraber et al, 1990; 1991). Diese ApoE-Monomere stehen so nahezu vollständig für die Interaktion mit Rezeptoren zur Verfügung, so dass ApoE4-Moleküle eine größere Bindungsaffinität zu verschiedenen Lipoprotein-Rezeptoren zu besitzen scheinen (Bohnet et al, 1996). Für die ApoE-Isoformen ApoE3 und ApoE4 kann dabei mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass keine der Isoformen direkt an den Stoffwechsel des ApoB gekoppelt sein dürfte, da sich die kinetischen Parameter so deutlich voneinander unterscheiden.

Ob eine der ApoE-Isoformen enger an das Schicksal einer bestimmten Lipoproteinfraktion gebunden ist, und ob bei den ähnlichen Umsatzraten des ApoCIII und des ApoE4 darüberhinaus Schlüsse über miteinander verbundene Stoffwechselwege gezogen werden können, lässt sich bei der geringen Datenmenge nicht beurteilen.

Bereits Gregg et al konnten jedoch schon 1986 bei der Untersuchung von normolipämischen Probanden mit ApoE-Phänotyp E3/E3 gegenüber ApoE-Phänotyp E4/E4 zeigen, dass diese Individuen unterschiedliche Lipoprotein-Konzentrationen und Apoprotein-Zusammensetzungen der Plasmalipoproteine aufweisen, sowie durch unterschiedliches Stoffwechselverhalten der Lipoproteine (Plasma-Verweilzeit, Synthese- und Abbaurate) gekennzeichnet sind. So finden sich bei den für ApoE4 homozygoten Probanden regelhaft höhere Spiegel an VLDL und niedrigere Konzentrationen an HDL. Batal et al zeigte, dass mit steigender VLDL-Konzentration der Anteil der Apoproteine ApoE und ApoC in der VLDL-

Fraktion zunimmt. Gleichzeitig sinke der Anteil an ApoE und ApoC, der mit der HDL-Fraktion assoziiert ist. Während bei Normolipämikern der größte Anteil des ApoE und ApoC mit der HDL-Fraktion assoziiert ist, ist der Hauptteil an ApoE bei Hypertriglyceridämikern im VLDL bestimmbar (Blum et al, 1982). Bei bestimmten Fettstoffwechselstörungen, z. B. bei Hypertriglyceridämien, ist der Anteil des ApoE in der VLDL-Fraktion auch absolut erhöht, der Anteil des HDL-ApoE im Vergleich dazu jedoch nur geringgradig höher als bei Normolipämikern (Batal et al, 2000). Bei Patienten mit erhöhten Plasma-Lipidspiegeln könnte also gerade die Verteilung der Apoproteine zwischen den Lipoproteinfractionen damit eine Ursache für eine verminderte oder verzögerte Elimination der VLDL-Partikel aus der Zirkulation sein.

Bei Patienten mit erhöhten Plasmacholesterinspiegeln findet sich darüber hinaus überzufällig häufig die ApoE-Isoform ApoE4. Davignon et al (1988) führten das unterschiedliche Stoffwechsel-Verhalten der Lipoproteine u. a. auf die Rezeptor-Bindungsfähigkeit der Apoprotein-Isoformen, sowie auf deren unterschiedlichen Affinität zu den einzelnen Lipoprotein-Klassen zurück (s.o.). Eine besondere Assoziation des ApoE4 mit der VLDL-Fraktion könnte letztlich auch die Ursache für die in dieser Arbeit ermittelten Daten zum Stoffwechsel der beiden ApoE-Isoformen sein. Die Tatsache, dass im Vergleich der beiden ApoE-Isoformen ApoE4 durch einen deutlich schnelleren Umsatz als ApoE3 gekennzeichnet ist, wirft die Frage auf, in wie weit der VLDL-Metabolismus bei Patienten mit ApoE4-Phänotyp direkt vom Stoffwechsel des ApoE4 beeinflusst wird.

In dieser Arbeit sollte zusätzlich neben den normolipämischen Probanden exemplarisch bei einem Probanden mit hypertriglyceridämischem Lipidprofil mit Triglyceridwerten >450mg/dl gezeigt werden, dass auch hier die Auftrennung der Apolipoproteine mittels HPLC möglich ist. Wie bereits beschrieben, war bei diesen Triglyceridspiegeln und damit höheren Apoprotein-Konzentrationen in den triglyceridreichen Lipoproteinen die Isolation der einzelnen Apoproteine weniger störungsempfindlich. Die einzelnen Apolipoproteine konnten mit dieser Methodik sehr gut isoliert werden. Aus den in den einzelnen Apoprotein-Fractionen gemessenen Anreicherungen wurden die Tracer/Tracee-Ratios ermittelt. Zur Quantifizierung der Produktionsrate und FCR wurde dasselbe Multi-Kompartiment-Modell verwendet.

Soweit dies aus Untersuchungen bei einem Probanden mit erhöhten Triglyceridspiegeln abgeleitet werden kann, zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Isolation der Apolipoproteine ApoC und ApoE über High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) auch bei Patienten mit Hypertriglyceridämie gut möglich und eine Alternative zu anderen Trennungsv erfahren ist. Die Schwierigkeiten, die sich bei Probanden mit sehr niedrigen Apoprotein-Konzentrationen

bei der Differenzierung der ApoE-Isoformen ergeben, lassen sogar vermuten, dass die Auftrennung der Apoprotein-Fraktionen über die HPLC gerade bei Patienten mit hohen Triglycerid-Werten eine geeignete Methode darstellt.

In zahlreichen Publikationen wurden die Konzentrationen der verschiedenen Apolipoproteine in Abhängigkeit zu Veränderungen der Plasma-Lipid-Zusammensetzung analysiert. Bereits Huff et al (1981) konnten die signifikant höheren VLDL-ApoCIII-Konzentrationen bei hypertriglyceridämischen Probanden auf einen geringeren Apoprotein-Umsatz, bei gleichzeitig verzögerter VLDL-Elimination aus der Zirkulation und einer längeren Plasma-Verweilzeit zurückführen. Die höheren VLDL-ApoB-Konzentrationen bei Individuen mit erhöhten Triglyceridwerten wurden zuletzt von Batal et al (2000) gerade nicht auf eine ApoB-Mehrproduktion zurückgeführt, sondern seien Ergebnis eines wesentlich langsameren Umsatzes des ApoB-Pools. Bei den um ein mehrfaches erhöhten ApoCIII-Konzentrationen dieser Probanden zeigte sich im Gegensatz dazu, dass die höheren ApoCIII-Konzentrationen mehr durch eine gesteigerte Apoprotein-Produktion als durch den gleichzeitig verminderten Apoprotein-Katabolismus verursacht werden. Für ApoE scheint in dieser Untersuchung ebenfalls die Mehrproduktion an Apoprotein im Vordergrund für die veränderten Apoprotein-Konzentrationen zu stehen. Huang et al (1998) konnten an HepG2-Zellen demonstrieren, dass bei Probanden mit Hypertriglyceridämie eine Überexpression an ApoE3 im direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten VLDL-Produktion und einer verminderten VLDL-Lipolyse steht. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte exemplarisch anhand der Untersuchung eines hypertriglyceridämischen Probanden gezeigt werden, dass die signifikant höheren VLDL-ApoB-Konzentrationen auf den deutlich reduzierten Apoprotein- bzw. VLDL-Umsatz und nicht auf eine ApoproteinB-Mehrsynthese zurückgeführt werden können. Für die VLDL-Apoproteine ApoCIII und ApoE3 scheinen bei diesem Probanden sowohl der geringere Apoprotein-Katabolismus als auch die gesteigerte Produktion eine Rolle zu spielen.

Die Untersuchung dieser Auffälligkeiten bei Probanden mit hypertriglyceridämischem Lipidprofil stand nicht im Zentrum dieser Arbeit. Die für Proband Nr. 7 ermittelten Plasma- und VLDL-Apoprotein-Konzentrationen entsprechen jedoch den bekannten Daten mit einer starken Korrelation zwischen Triglycerid-Spiegel und Apolipoprotein-Konzentration. Darüber hinaus zeigen die ermittelten Stoffwechselfparameter in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Huff et al, 1981; Blum et al, 1982; Huang et al, 1998; Batal et al, 2000), dass erhöhte Plasma-Triglyceridspiegel assoziiert sind mit einem deutlich verzögerten Abbau der VLDL-Apoproteine (ApoB, ApoCIII, ApoE3), einer längeren Verweildauer in der Zirkulation und einer gesteigerten Produktion an ApoCIII und ApoE, nicht aber mit einer Mehrproduktion an VLDL-ApoB. Da die Rezeptor-vermittelte Entfernung der VLDL-Partikel

aus der Zirkulation durch die Maskierung der ApoE-Moleküle durch ApoCIII verzögert und der rasche lipolytische Abbau der triglyceridreichen Partikel durch die Lipoproteinlipase von ApoCIII direkt inhibiert wird, erscheint die reduzierte VLDL-Clearance nach den vorliegenden Ergebnissen bei diesen Patienten nicht zuletzt wesentlich durch den Stoffwechsel des ApoCIII beeinflusst zu werden.

5. Zusammenfassung

Veränderungen des Fettstoffwechsels spielen in vielen Bereichen der Medizin eine wichtige Rolle. Die in-vivo Untersuchung des Stoffwechsels einzelner Apolipoproteine erlaubt die Klärung physiologischer Regulationsprinzipien des Lipoproteinstoffwechsels und die Beschreibung pathophysiologischer Mechanismen bei Dyslipoproteinämien.

Die hier vorgestellten Untersuchungen beschreiben den Stoffwechsel der VLDL-Apolipoproteine ApoB, ApoCIII und ApoE bei 6 normolipämischen und einem hypertriglyceridämischen Probanden mit einer endogenen nicht-radioaktiven Tracermethode. Als Tracer wurde mit D₃ markiertes Leucin eingesetzt. Nach Abtrennung der verschiedenen Plasmalipoproteinklassen durch präparative Ultrazentrifugation und Isolierung der Apolipoproteine wurde die Anreicherung des Tracers mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. Aus dem zeitlichen Verlauf der Anreicherung des Tracers in den VLDL-Apoproteinen wurden kinetische Parameter wie Produktions- und Katabolismusraten für die einzelnen Apolipoproteine abgeleitet.

Zum ersten Mal wurden in dieser Untersuchung VLDL-ApoCIII und VLDL-ApoE mittels HPLC aus der VLDL-Fraktion isoliert. Es zeigte sich, dass dieses Isolationsverfahren bei normolipämischen und hypertriglyceridämischen Individuen anwendbar ist.

In den so isolierten Apolipoproteinen konnten die Tracer-Anreicherungen bestimmt und aus den Anreicherungsdaten über spezifische Multi-Kompartiment-Modelle kinetische Parameter abgeleitet werden. Bei der Quantifizierung der Stoffwechselfparameter konnte gezeigt werden, dass sich die Produktions- und Umsatzraten des VLDL-ApoCIII und des VLDL-ApoE3 signifikant von denen des VLDL-ApoB unterscheiden und dabei deutlich unter den Daten des VLDL-ApoB liegen.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Apoproteine ApoCIII und ApoE nicht unmittelbar an das Schicksal einzelner VLDL-Partikel gebunden sind, sondern zwischen verschiedenen Lipoprotein-Partikeln ausgetauscht werden können und so mehr als einmal durch den Pool der VLDL zirkulieren, bevor sie aus der Zirkulation eliminiert werden.

In welchem Ausmaß andere Lipoprotein-Fraktionen, z. B. HDL, oder andere intra- oder extravaskuläre Protein-Pools an den Austausch- und Transfer-Prozessen der Apoproteine beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen zum Apoprotein-Stoffwechsel zeigen.

6. Literaturverzeichnis

Adams RF. 1974. **Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography.** J. Chromatogr. 1974. 95:189-212

Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ. 1972. **Studies on the composition and structure of plasma lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins.** Biochim. Biophys. Acta. 1972. 260: 689-707

Andrews TC, Raby K, Barry J, Naimi CL, Allred E, Ganz P, Selwyn AP. 1997. **Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease.** Circulation. 1997. 95:324-328

Assmann G, Schmitz G, Menzel HJ, and Schulte H. 1984. **Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia.** Clin. Chem. 1984. 30:641-643

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. 1988. **Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction.** J. Am. Med. Assoc. 1988. 260:1917-1921

Barrett PHR, Baker N, and Nestel PJ. 1991. **Model development to describe the heterogeneous kinetics of apolipoprotein B and triglyceride in hypertriglyceridemic subjects.** J. Lipid Res. 1991. 32:743-762

Barrett PHR, Foster D. 1996. **Design and analysis of lipid tracer kinetic studies.** Curr. Op. Lipidol. 1996.7:143-148

Batal R, Tremblay M, Barrett PHR, Jaques H, Fredenrich A, Mamer O, Davignon J, Cohn JS. 2000. **Plasma Kinetics of apoCIII and apoE in normolipemic and hypertriglyceridemic subjects.** J. Lipid Res. 2000. 41:706-718

Beltz WF, Kesäniemi YA, Howard BV, and Grundy SM. 1985. **Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low density lipoproteins, intermediate density lipoproteins, and low density lipoproteins.** J. Clin. Invest. 1985. 76:575-585

Beltz WF, Kesäniemi YA, Miller NH, Fisher WR, Grundy SM, and Zech LA. 1990. **Studies on the metabolism of apolipoprotein B in hypertriglyceridemic subjects using simultaneous administration of tritiated leucine and radioiodinated very low density lipoprotein.** J. Lipid. Res. 1990. 31:361-374

Berman M, Hall M, III, Levy RI, Eisenberg S, Bilheimer DW, Phair RD, and Goebel RH. 1978. **Metabolism of apoB and apoC lipoproteins in man: kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects.** J. Lipid Res. 1978. 19:38-54

Blum CB. 1982. **Dynamics of apolipoprotein E metabolism in humans.** J. Lipid Res. 1982. 23:1308-1316

Bohnet K, Pillot T., Visvikis S, Sabolovic N, Siest G. 1996. **Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors.** J. Lipid Res. 1996. 37:1316-1324

Brewer HB Jr, Shulman R, Herbert P, Ronan R, and Wehrly K. 1973. **The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoCIII), an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins.** J. Biol Chem. 1973. 247:4975-4984

Brown MS, Goldstein JL. 1997. **The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor.** Cell. 1997. 89: 331-340

Bukberg PR, Le NA, Ginsberg HN, Gibson JC, Rubinstein A, and Brown WV. 1985. **Evidence for non-equilibrating pools of apolipoprotein C-III in plasma lipoproteins.** J. Lipid Res. 1985. 26:1047-1057

Calder AG, Smith A. 1988. **Stable isotope ratio analysis of leucine and ketoisocaproic acid in blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Use of tertiary butylmethylsilyl derivatives.** Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988. 2:14-16

Cartwright IJ, Plonne D, Higgins JA. 2000. **Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes.** J. Lipid Res. 2000. 41:1728-1739

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. 1986. **Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study.** JAMA. 1986. 256:2835-2838

Cobelli C, Toffolo G, Bier DM and Nosadini R. 1987. **Models to interpret kinetic data in stable isotope tracer studies.** Am. J. Physiol. 1987. 253:E551-E564

Cobelli C, Toffolo G, and Foster DM. 1992. **Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism.** Am. J. Physiol. 1992. 262:E968-E975

Cohn JS, Wagner DA, Cohn SD, Millar JS, and Schaefer ES. 1990. **Measurement of Very Low Density and Low Density Lipoprotein Apolipoprotein (Apo)B-100 and High Density Lipoprotein Apo A-I Production in human subjects using deuterated Leucine.** J. Clin. Invest. 1990. 85:804-811

Cooper AD. 1997. **Hepatic uptake of chylomicron remnants.** J. Lipid Res. 1997. 38:2173-2192

Cremer P, Mücke R. 1990. **The Goettingen Risk, Incidence and Prevalence (GRIPS) Study. Recommendations for the prevention of coronary heart disease.** Ther. Umsch. 1990. 47:482-491

Cremer P, Elster H, Labrot B, Kruse B, Mücke R, Seidel D. 1988. **Incidence rates of fatal and nonfatal myocardial infarction in relation to the lipoprotein profile: first prospective results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS).** Klin. Wochenschr. 1988. 66 Suppl 11:42-49

Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Müller-Berninger R, Elster H, Seidel D. 1997. **Ten-year follow up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men.** Atherosclerosis. 1997. 129:221-230

Cryer DR, Matsushima T, Marsh JB, Yudkoff M, Coates PM, and Cortner JA. 1986. **Direct measurement of apolipoprotein B synthesis in human very low density lipoprotein using stable isotopes and mass spectrometry.** J. Lipid Res. 1986. 27:508-516

Curry MD, McConathy WJ, Fesmire JD, and Alaupovic P. 1980. **Quantitative determination of human apolipoprotein CIII by electroimmunoassay.** Biochim. Biophys. Acta. 1980. 617:503-513

Dagher FJ, Lyons JH, Finlayson DC, Shamsai J, Moore FD. 1965. **Blood volume measurement: a critical study.** Advanc. Surgery. 1965. 1:69-109

Dallongeville J, Baugé E, Lebel P, Fruchart JC. 1997. **Fat ingestion is associated with increased levels of apoC-III and apoE-B-containing lipoprotein particles in humans.** Eur. J. Clin. Invest. 1997. 27:1055-1060

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. 1988. **Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis.** Arteriosclerosis. 1988. 8:1-21

Demant T, Shepherd J, and Packard CJ. 1988. **Very low density lipoprotein apolipoprotein B metabolism in humans.** Klin. Wochenschr. 1988. 66:703-712

Demant T, Bedford D, Packard CJ, and Shepherd J. 1991. **Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B100 metabolism in normolipemic subjects.** J. Clin. Invest. 1991. 88:1490-1501

Demant T, Packard CJ, Stewart P, Bedynek A, Calder AG, Shepherd J, and Seidel D. 1994. **Sensitive mass spectrometry techniques for measuring metabolism of human apolipoprotein B in vivo.** Clin. Chem. 1994. 40:1825-1827

Demant T, Packard CJ, Demmelmair H, Stewart P, Bedynek A, Bedford D, Seidel D, and Shepherd J. 1996. **Sensitive methods to study human apolipoprotein B metabolism using stable isotope-labeled amino acids.** Am. J. Physiol. 1996. 270:E1022-E1036

Demant T, Packard CJ. 1998. **In vivo studies of VLDL metabolism and LDL heterogeneity.** Eur. Heart J. 1998. 19 Suppl H:H7-10

Dong LM, Weisgraber KH. 1996. **Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins.** J. Biol. Chem. 1996. 271:19053-19057

Egusa G, Brady DW, Grundy SM, Howard BV. 1983. **Isopropanol precipitation method for the determination of apoB specific activity and plasma concentration during metabolic studies of VLDL-apoB.** J. Lipid Res. 1983. 24: 1261-1267

Fazio S, Yao Z, McCarthy BJ, Rall SC Jr. 1992. **Synthesis and secretion of apolipoprotein E occur independently of synthesis and secretion of apolipoprotein B containing lipoproteins in HepG2 cells.** J. Biol. Chem. 1992. 267:6941-6945

Fazio S, Yao Z. 1995. **The enhanced association of apolipoprotein E with apolipoprotein B-containing lipoproteins in serum-stimulated hepatocytes occurs intracellularly.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995. 15:593-600

Fisher WR, Zech LA, Kilgore LL, and Stacpoole PW. 1991. **Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: studies with a [3H]leucine tracer.** J. Lipid Res. 1991. 32:1823-1836

Foster DM, Aamodt RL, Henin RJ, and Berman M. 1979. **Zink Metabolism in Humans: a Kinetic Model.** Am J Physiol 1979. 237: R340-R349

Foster DM, Chait A, Albers JJ, Failor RA, Harris C, and Brunzell JD. 1986. **Evidence for Kinetic Heterogeneity among Human Low Density Lipoproteins.** Metabolism 1986. 35: 685-695

Fredenrich A, Giroux LM, Tremblay M, Krimbou L, Davignon J, and Cohn JS. 1997. **Plasma lipoprotein distribution of apoCIII in normolipemic and hypertriglyceridemic subjects: comparison of the apoCIII to apoE ratio in different lipoprotein fractions.** J. Lipid Res. 1997. 38: 1421-1432

Friedewald WT, Levy RT, Fredrickson DS. 1972. **Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge.** Clin. Chem. 1972. 18:499-502

Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. 1981. **Lipoproteins, Cardiovascular Disease, and Death. The Framingham Study.** Arch. Intern. Med. 1981. 141:1128-1131

Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, and H. B. Brewer HB Jr. 1984. **ApolipoproteinE metabolism in normolipoproteinemic human subjects.** J. Lipid Res. 1984. 25:1167-1176

Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D and Brewer HB Jr. 1986. **Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans.** J. Clin. Invest. 1986. 78:815-821

Gregg RE, Brewer HB Jr. 1988. **The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in human plasma.** Clin. Chem. 1988. 32:B28-B32

Halliday D, Venkatesan S, and Pacy P. 1993. **Apolipoprotein metabolism: a stable-isotope approach.** Am. J. Clin. Nutr. 1993. 57:726S-731S

Havekes LM, de Kniff P, Beisiegel U. 1987. **A rapid micromethod for apoE phenotyping directly in serum.** J. Lipid Res. 1987. 28:455-463

Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. 1997. **Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality.** JAMA. 1997. 278:313-321

Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr., Taylor JM, v. Eckardstein A, Assmann G, and Mahley RW. 1998. **Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia.** J. Biol. Chem. 1998. 273:26388-26393

Huff MW, Fidge NH, Nestel PJ, Billington T, and Watson B. 1981. **Metabolism of C-apolipoproteins: kinetics of C-III1 and C-III2, and VLDL-apolipoprotein B in normal and hyperlipoproteinemic subjects.** J. Lipid Res. 1981. 22:1235-1246

Kesaniemi YA, Vega GL, and Grundy SM. 1982. **Kinetics of apolipoprotein B in normal and hyperlipidemic man: review of current data.** In: M. Berman, S. M. Grundy, B. V. Howard (Hrsg.) Lipoprotein Kinetics and Modeling. Academic Press, New York. 181-205

Kjekshus J, Pedersen TR. 1995. **Reducing the risk of coronary events: evidence from the Scandinavian Simvastatin Study (4S).** Am. J. Cardiol. 1995. 76:64C-68C

Klein RL, Zilversmit DB. 1984. **Direct Determination of human and rabbit apolipoprotein B selectively precipitated with butanol-isopropyl ether.** J. Lipid Res. 1984. 25:1380-1386

Koren E, Corder C, Mueller G, Centrurion H, Hallum G, Fesmire J, McConathy WD, Alaupovic P. 1996. **Triglyceride enriched lipoprotein particles correlate with the severity of coronary artery disease.** Atherosclerosis. 1996. 122:105-115

Kostner G und W März. 2001. **Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine.** In P. Schwandt, W. O. Richter, K. G. Parhofer (Hrsg.) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 2001. S. 1-57

Krauss RM, Burke DJ. 1982. **Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans.** J. Lipid Res. 1982. 23:97-104

Krauss RM. 1994. **Heterogeneity of plasma low density lipoproteins and atherosclerosis risk.** Curr. Opin. Lipidol. 1994. 5: 339-349

Levy D, Kannel WB. 1988. **Cardiovascular risks: New insights from Framingham.** Am. Heart J. 1988. 166:266-272

Lichtenstein AH, Cohn JS, Hachey DL, Millar JS, Ordovas JM, and Schaefer EJ. 1990. **Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics.** J. Lipid Res. 1990. 31:1693-1701

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 1951. 193:265-275

Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, Fruchart JC, and Ducimetiere P. 1996. **Apolipoproteins CIII and E in apoB and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study.** J. Lipid Res. 1996. 37:508-517

Mahley RW, Huang Y. 1999. **ApoE: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond.** Curr. Opin. Lipidol. 1999. 10: 207-217

Malmendier CL, Lontie JF, Grutman GA, and Delcroix C. 1988. **Metabolism of apolipoprotein C-III in normolipemic human subjects.** Atherosclerosis. 1988. 69:51-59

Marcoux C, Tremblay M, Fredenrich A, Jacques H, Krimbou L, Nakajima K, Davignon J, Cohn JS. 1998. **Plasma remnant-like particle lipid and apolipoprotein levels in normolipemic and hyperlipidemic subjects.** Atherosclerosis. 1998. 139:161-171

Matthews DE, Ben-Galin E, Bier DM. 1979. **Determination of stable isotopic enrichment in individual plasma amino acids by chemical ionization mass spectrometry.** Anal. Chem. 1979. 51:80-84

Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G. 1983. **Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease.** Arteriosclerosis. 1983. 3:310-315

Millar JS, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Ordovas JM, and Schaefer EJ. 1998. **Proposal of a multicompartmental model for use in the study of apolipoprotein E metabolism.** Metabolism. 1998. 47:922-928

Millar JS and Packard CJ. 1998. **Heterogeneity of apolipoprotein B100-containing lipoproteins what we have learnt from kinetic studies.** Curr. Opin. Lipidol. 1998. 9:197-202

Noel SP, Rubinstein D. 1974. **Secretion of apolipoproteins in very low density and high density lipoproteins by perfused rat liver.** J. Lipid Res. 1974. 15:301-308

Packard CJ, Gaw A, Demant T, and Shepherd J. 1995. **Development and application of a multicompartmental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism.** J. Lipid Res. 1995. 36:172-187

Packard CJ, Demant T, Steward JP, Bedford F, Caslake MJ, Schwertfeger G, Bedynek A, Shepherd J, and Seidel D. 2000. **Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions.** J. Lipid Res. 2000. 41:305-317

Parhofer KG, Barrett PHR, Bier DM, and Schonfeld G. 1991. **Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes.** J. Lipid Res. 1991. 32:1311-1323

Parhofer KG, Barrett PHR, Bier DM, and Schonfeld G. 1992. **Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein apo-B89 are cleared from human plasma more rapidly than apolipoprotein apoB100 containing lipoproteins in vivo.** J. Clin. Invest. 1992. 89:1931-1937

Parhofer KG, Barrett PHR, Dunn J, Schonfeld G. 1993. **Effect of pravastatin on metabolic parameters of apolipoprotein B in patients with mixed hyperlipoproteinemia.** Clin. Invest. 1993. 71:939-946

Parhofer KG, Barrett PHR, Demant T, Richter WO, Schwandt P. 1996. **Effects of weekly LDL-apheresis on metabolic parameters of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia.** J. Lipid Res. 1996. 37:2383-2393

Parhofer KG, Barrett PHR, Schwandt P. 1999. **Low density lipoprotein apolipoprotein B metabolism: comparison of two methods to establish kinetic parameters.** Atherosclerosis. 1999. 144:159-166

Parhofer KG, Barrett PHR, Demant T, Schwandt P. 2000. **Acute Effects of low density lipoprotein apheresis on metabolic parameters of apolipoprotein B.** J. Lipid Res. 2000. 41:1596-1603

Patterson BW, Hachey DL, Cook GL, Amann JM, and Klein PD. 1991. **Incorporation of a stable isotopically labeled amino acid into multiple human apolipoproteins.** J. Lipid Res. 1991. 32:1063-1072

Patterson, BW. 1997. **Use of stable isotopically labeled tracers for studies of metabolic kinetics: an overview.** Metabolism. 1997. 46:322-329

Patterson BW, Zhang XJ, Chen YP, Klein S, and Wolfe RR. 1997. **Measurement of very low stable isotope enrichments by Gas Chromatography/Mass Spectrometry: application to measurement of muscle protein synthesis.** Metabolism. 1997. 46:943-948

Patterson BW, Zhao G, and Klein S. 1998. **Improved accuracy and precision of Gas Chromatography/Mass Spectrometry measurement for metabolic tracers.** Metabolism. 1998. 47:706-712

Pedersen TR. 1998. **Coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study experience.** Am. J. Cardiol. 1998. 82:53T-56T

Pietzsch J, Wiedemann B, Julius U, Nitzsche S, Gehrisch S, Bergmann S, Leonhardt W, Jaross W, Hanefeld M. 1996. **Increased clearance of low density lipoprotein precursors in patients with heterozygous familial defective apolipoprotein B-100: a stable isotope approach.** J. Lipid Res. 1996. 37:2074-2087

Plehn JF, Davis BR, Sacks FM, Rouleau JL, Pfeffer MA, Bernstein V, Cuddy TE, Moye LA, Piller LB, Rutherford J, Simpson LM, Braunwald E. 1999. **Reduction of stroke incidence after myocardial infarction with pravastatin: the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) study. The Care Investigators.** Circulation. 1999. 99:216-223

Pont F, Duvillard L, Vergès B, Gambert P. 1998. **Development of Compartment Models in stable-isotope experiments. Application to lipid metabolism.** Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol. 1998. 18:853-860

Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. 1982. **Human ApoE: the complete amino acid sequence.** J. Biol. Chem. 1982. 257: 4171-4178

Ramakrishnan R, Arad Y, Wong S, Ginsberg HN. 1990. **Nonuniform radiolabeling of VLDL-apolipoprotein B – Implications for the analysis of studies of the kinetics of the metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein B.** J. Lipid Res. 1990. 31:1031-1042

Rensen PC, Jong MC, van Vark LC, van der Boom H, Hendriks WL, van Berkel TJ, Biessen EA, Havekes LM. 2000. **Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis.** J. Biol. Chem. 2000. 275:8564-8571

Sacks FM, Moye LA, Davis BR, Cole TG, Pouleau JL, Nash DT, Pfeffer MA, Braunwald E. 1998. **Relationship between plasma LDL concentration during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial.** Circulation. 1998. 97:1446-1452

Schwartz HP, Karl IE, Bier DM. 1980. **The alpha-keto acids branched-chain amino acids: simplified derivatization for physiological samples and complete separation as quinoxalinols by packed column gas chromatography.** Anal. Biochem. 1980. 108:360-366

Steinmetz A. 1991. **Clinical implications of the apolipoprotein E polymorphism and genetic variants: current methods for apo E phenotyping.** Ann. Biol. Clin. 1991. 49:1-8

Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PHR, Attie AD. 2000. **The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion.** J. Clin. Invest. 2000. 105:521-532

Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, and Steinmetz A. 1984. **Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia.** Hum. Genet. 1984. 65:232-236

Weisgraber KH. 1990. **Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: Role of the cysteine-arginine interchange at residue 112.** J. Lipid Res. 1990. 31:1503-1511

Weisgraber KH, Shinto LH. 1991. **Identification of the disulfed-linked homodimer of apolipoprotein E3 in plasma: Impact on receptor binding activity.** J. Biol. Chem. 1991. 266:12029-12034

West of Scotland Coronary Prevention Study Group, 1998. **Influence of Pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS).** Circulation. 1998. 97:1440-1445

Zech LA, Grundy SM, Steinberg D, and Berman M. 1979. **Kinetic model for production and metabolism of very low density lipoprotein triglycerides.** J. Clin. Invest. 1979. 63:1262-1273

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1.2.1	Eigenschaften der Plasmalipoproteine	8
Tab. 1.2.2	Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas	8
Tab. 1.2.3	Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine	8
Tab. 1.4	Apolipoproteine des menschlichen Plasmas	15
Tab. 2.1	Charakterisierung Probanden Nr. 1 – 6	20
Tab. 2.2	Charakterisierung Proband Nr. 7	20
Abb. 2.3	HPLC-Lauf Proband Nr. 1 (ApoE-Phänotyp E3/E4)	25
Abb. 2.4	Multi-Kompartiment-Modell	31
Tab. 3.1.1	VLDL-Konzentrationen Probanden Nr. 1 – 6	33
Tab. 3.1.2	VLDL-Apolipoprotein-Konzentrationen Probanden Nr. 1 – 6	33
Abb. 3.2.1		35
-	HPLC-Lauf Probanden Nr. 1 – 6	-
Abb. 3.2.6		40
Abb. 3.3.4	Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 4	41
Abb. 3.3.1a	Tracer/Tracee-Ratio ApoE-Isoformen Proband Nr. 1	44
Abb. 3.3.1		45
-	Tracer/Tracee-Ratio Probanden Nr. 1, 2, 3, 5, 6	-
Abb. 3.3.6		49

Abb. 3.4	Tracer/Tracee-Ratio Probanden Nr. 1 – 6	50
Abb. 3.4.1	Tracer/Tracee-Ratio VLDL-ApoB und LDL-ApoB	51
Abb. 3.4.2	Tracer/Tracee-Ratio VLDL-ApoCIII	51
Abb. 3.4.3	Tracer/Tracee-Ratio VLDL-ApoE3	51
Tab. 3.4.1	Kinetische Parameter Probanden Nr. 1 – 6	52
Tab. 3.4.2	Kinetische Parameter ApoE-Isoformen Proband Nr. 1	53
Tab. 3.5.1	Charakterisierung Proband Nr. 7	54
Abb. 3.5.1	HPLC-Lauf Proband Nr. 7	55
Tab. 3.5.2	VLDL-Konzentrationen Proband Nr. 7	56
Tab. 3.5.3	VLDL-Apolipoprotein-Konzentrationen Proband Nr. 7	56
Abb. 3.5.2	Tracer/Tracee-Ratio Proband Nr. 7	57
Tab. 3.5.4	Kinetische Parameter Proband Nr. 7	59

7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Transferase
Apo	Apolipoprotein = Apoprotein
BMI	Body Mass Index
CETP	Cholesterinester Transferprotein
FCR	Fractional Catabolic Rate
HDL	High Density Lipoproteins
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
Lp	Lipoproteine
LDL	Low Density Lipoproteins
LDL-R	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor Related Protein
β-MAG	β-Monoacylglyceride
MTP	Microsomal Transfer Protein
MW	Molecular Weight
PR	Production Rate
TG	Triglyceride
VLDL	Very Low Density Lipoproteins

7.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Paumgartner, Herrn Prof. Dr. med. P. Schwandt, Herrn Prof. Dr. med. B. Göke und Herrn Prof. Dr. med. D. Seidel danke ich für die Möglichkeit zu wissenschaftlicher Arbeit im Forschungslabor der Arbeitsgruppe Stoffwechsel der Medizinischen Klinik und Poliklinik II und im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn PD Dr. med. Th. Demant möchte ich vor allem für die unproblematische Benutzung des Massenspektrometers und insbesondere Frau A. Bedynek für die Unterstützung bei der Bestimmung der Tracerdaten danken.

Herrn Dr. P. H. R. Barrett, University of Western Australia, Perth, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung der Untersuchungsdaten.

Den medizinischen Assistentinnen des Forschungslabors, Frau E. Fleischer-Brielmaier, Frau K. Henze und Frau I. Biller-Friedmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Großen Dank möchte ich auch den 7 Probanden sagen, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. K. G. Parhofer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Forschungslabor der Arbeitsgruppe Stoffwechsel an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, für die zahlreichen Anregungen und kritischen Diskussionen und vor allem für seine sehr engagierte Betreuung.